# VERGLEICHENDE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MEMBRANSTRUKTUREN VON LATENT LEBENDEN ORGANISMEN VERSCHIEDENER SYSTEMATISCHER STELLUNG ZUR FRAGE DES UNIT - MEMBRANE - KONZEPTES

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Wecke
aus Berlin

1969

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

# VERGLEICHENDE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MEMBRANSTRUKTUREN VON LATENT LEBENDEN ORGANISMEN VERSCHIEDENER SYSTEMATISCHER STELLUNG ZUR FRAGE DES UNIT - MEMBRANE - KONZEPTES

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Wecke
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I. Referent: Priv.-Doz. Dr. P. Giesbrecht
II. Referent: Prof.Dr.H. Lüers

Tag der mündlichen Prüfung : 3. XII. 1968

Tag der Promotion : 17. FEB. 1969

# INHALTSVERZEICHNIS


Seite

Einleitung

A. Allgemeines 1

B. Literaturübersicht

I. Frostresistenz und Gefrierschutz von verschiedenen Organismen 1

II. Die Ultrastruktur von Membransystemen in der Zelle

1.) Plasten

a. Photosynthetischer Apparat

$a_1$) Lichtmikroskopische Untersuchungen an Chloroplasten 5

$a_2$) Chemische Analyse von Chloroplasten 5

$a_3$) Physikalische Methoden zur Aufklärung der Chloroplastenstruktur 6

$a_4$) Elektronenmikroskopisch darstellbare Feinstrukturen des photosynthetischen Apparates

Das Thylakoidsystem 7
Matrix und Einschlüsse 8
Makromolekularer Bau der Thylakoide 9

b. Mitochondrien 11

2.) Plasmamembranen

a. Kernmembran

$a_1$) Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kernhülle 13

$a_2$) Feinstruktur der Kernmembran im Elektronenmikroskop 14

b. Cytoplasmamembran 16

c. Golgi-Apparat 19

d. Multivesicular Bodies 21

Seite

Material und Methoden 25

Untersuchungsergebnisse

A. Systematische Untersuchungen des Gefrierschutzes verschiedener Organismen als Voraussetzung für die allgemeine Anwendbarkeit des Gefrierätzver - fahrens 31

B. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Membransystemen

I. Plasten

1.) Photosynthetischer Apparat 39

a. Dinoflagellaten 39

b. Euglenen 39

c. Grünalgen 39

$a_1$) Befunde über die Ultrastruktur von Chloroplasten normal er - grünter Chlorellazellen 4o

$a_2$) Die Ultrastruktur der Chloro- plasten von gebleichten Chlo - rellazellen 41

d. Moose 42

e. Farne 43

f. Samenpflanzen

$f_1$) Befunde über die Feinstruktur des photosynthetischen Apparates mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens 43

$f_2$) Untersuchungen der Chloroplasten von Karottengewebekulturen mit Hilfe der Dünnschnitt - Technik 44

$f_3$) Ultrastruktur der Chloroplasten in normalen pflanzlichen Geweben 45

2.) Mitochondrien 46

II. Plasmamembranen

1.) Kernmembran 46

a. Dinoflagellaten 46

b. Euglenen 47

c. Grünalgen 48

d. Penicillium 48

Seite

e. Asplenium 48

f. Daucus und Crocus 48

g. FL-Zellen 49

2.) Cytoplasmamembran

a. Ultrastruktur 51

3.) Golgi-Apparat 53

4.) Multivesicular Bodies 53

Diskussion

A. Zum Gefrierschutz von Organismen verschiedener systematischer Stellung 55

B. Zur vergleichenden Untersuchung der Membranstrukturen verschiedener Organismen mit Hilfe der Gefrierätztechnik 6o

I. Zum Artefaktproblem bei elektronenoptischer Präparation 6o

II.

1.) Zum Bau des photosynthetischen Apparates

a. Zur Anordnung des Thylakoidsystems in der Zelle 63

b. Zum makromolekularen Bau der Thylakoidmembran 65

c. Zur Frage des Quantasoms als photosynthetische Einheit 68

d. Vergleich verschiedener Thylakoidmodelle 71

2.) Zum makromolekularen Bau der Mitochondrien 76

III.

1.) Zum Bau der Kernmembran

a. Bau der Kernpore 76

b. Anordnung der Poren auf der Kernoberfläche 79

c. Funktion der Kernmembran 81

Seite

2.) Zum Bau der Cytoplasmamembran

a. Invaginationen 82

b. Partikelbesatz und mögliche Funktion der Partikel 83

3.) Zum Bau des Golgi-Apparates 85

4.) Zu den Multivesicular-Bodies 86

IV. Diskussion über das unit-membrane-Konzept 87

ZUSAMMENFASSUNG 9o

Literaturverzeichnis

Verzeichnis der im Text und den Bildunterschriften verwendeten Abkürzungen

| | | | |
|---|---|---|---|
| ANM | = Äußere Kernmembran | M | = Mitochondrion |
| BP | = Mit großen Partikeln besetzte Fläche der Thylakoidmembran | N | = Kern |
| | | NM | = Kernmembran |
| C | = Cytoplasma | NP | = Kernpore |
| CHL | = Chloroplast | P | = Pellikula |
| CHR | = Chromatophor | PE | = Hülle des photosynthetischen Apparates |
| CM | = Cytoplasmamembran | PW | = Primärwand |
| DMSO | = Dimethylsulphoxyd | SP | = Mit kleinen Partikeln besetzte Fläche der Thylakoidmembran |
| E | = Einschlußkörper | | |
| ER | = Endoplasmatisches Retikulum | SW | = Sekundärwand |
| G | = Dictyosom des Golgi-Apparates | T | = Tonoplast |
| INM | = Innere Kernmembran | V | = Vakuole |
| KOM | = Kokosnußmilch | W | = Zellwand |
| KP | = Kernpore | | |

# Einleitung

## Allgemeines

Die morphologische Mannigfaltigkeit im Organismenreich ist vor allem durch verschiedene Differenzierungsgrade der Gewebe verwirklicht. Diese Unterschiede sind makroskopisch oder lichtmikroskopisch erkennbar. Die Einführung der elektronenmikroskopischen Präparationstechnik in der Biologie führte dagegen zu der Erkenntnis, daß in den einzelnen Zellen der unterschiedlich differenzierten Gewebe und sogar in Organismen verschiedenster systematischer Stellung eine überraschende Einförmigkeit im relativ konstanten Bestand von Organellen und deren Bau besteht.

Dabei war es möglich, die Zelle ganz allgemein in Reaktionsräume oder Kompartimente einzuteilen. Von RUSKA (1960) sowie WOHLFAHRT - BOTTERMANN (1963) wurde jedem Kompartiment eine bestimmte plasmatische Phase zugeordnet. Die Autoren unterschieden in der tierischen Zelle Grundplasma, Karyoplasma, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgiapparat und den perinuclearen Spaltraum zwischen den beiden Kernmembranen. Als gesonderte Phase kämen noch die multivesicular bodies ( MVB) hinzu. Bei pflanzlichen Organismen werden die erwähnten Kompartimente ergänzt durch den photosynthetischen Apparat und die Vakuole. Eine Durchmischung all dieser Reaktionsräume wird verhindert durch Membranen, die demnach Grenzflächen zwischen den verschiedenen Phasen darstellen. Abgesehen von diesen Grenz- oder Hüllmembranen existieren auch Membranen, die Ort wichtiger Stoffwechselvorgänge sind ( Cristae der Mitochondrien, Thylakoide der Plastiden).

Deshalb erscheint die makromolekulare Struktur der Membranen für das Verständnis von zahlreichen in der Zelle ablaufenden Prozessen von besonderer Bedeutung zu sein. Wichtige Erkenntnisse über den Bau der Membranen sind vor allem von der modernen elektronenmikroskopischen Präparationstechnik, der Gefrierätzung, zu erwarten, da hierbei im Gegensatz zu älteren Präparationsmethoden latent lebende Zellen untersucht werden können. Damit lassen sich artifizielle Veränderungen der Zellstrukturen weitgehend ausschließen. Voraussetzung für die Anwendung dieser neuen Methode ist ein ausreichender Gefrierschutz der Zellen und Gewebe.

# Literaturübersicht

## Frostresistenz und Gefrierschutz von verschiedenen Organismen

Die wichtigste Voraussetzung für die allgemeine Anwendung des Gefrierätzverfahrens ist ein ausreichender Gefrierschutz der Zellen, die untersucht werden sollen. Es muß verhindert werden, daß das Wasser innerhalb der Zellen Eiskristalle bildet, denn diese würden die Zelle zerstören.

Je kleiner der Wassergehalt eines Objektes ist, desto besser läßt es sich einfrieren, weil das Intervall zwischen Gefrierpunkt und Rekristallisationspunkt, in dem eine Eiskristallbildung stattfinden kann, klein wird.

Normalerweise ist der Wassergehalt der lebenden Zellen jedoch so hoch, daß das Intervall, in dem die Eiskristallbildung erfolgt, sehr groß ist. Um dieses Intervall zu verkleinern, d.h. den Gefrierpunkt zu erniedrigen, müssen Gefrierschutzmittel in die Zelle eingeführt werden.

Das Einfrieren mit Hilfe der Gefrierschutzmittel kann auf zwei prinzipiell unterschiedlichen Wegen erreicht werden:

1. durch langsames Einfrieren und
2. durch rasches Einfrieren.

Wenn die Zellen langsam heruntergefroren werden ( Gefriergeschwindigkeit weniger als 1° C/min ), entstehen extrazellulär wachsende Eiskristalle, die eine allmähliche Dehydratation des Cytoplasmas und damit auch eine Erniedrigung des Gefrierpunktes bewirken. Dieses Phänomen liegt offensichtlich auch der natürlichen Frostresistenz zugrunde ( LEVITT, 1966)

Fußend auf dem langsamen Einfrieren befassen sich zahlreiche Untersuchungen mit der Erhaltung von Bakterien und tierischen Zellen unter Anwendung von Gefrierschutzmitteln.

Eines der am häufigsten angewendeten Gefrierschutzmittel ist das Glycerin, dessen Schutzwirkung zuerst von POLGE et al. (1949) aufgedeckt wurde Auch SMITH (1950) hatte beim Einfrieren von Erythrocyten mit Hilfe von Glycerin Erfolg. Die Wirksamkeit des Glycerins führte NASH (1966) auf dessen wasserähnliche Struktur zurück, die in Verbindung mit dem niedrigen Molekulargewicht ein Eindringen in die Zelle ermöglichen soll. Die Wirkung innerhalb der Zelle versuchte LOVELOCK (1953) damit zu erklären, daß das Glycerin die schädliche Konzentration der Elektrolyte, die beim Einfrieren freiwerden, herabsetzt.

Beschränkter in der Anwendung als Gefrierschutzmittel scheint Äthylenglycol zu sein, obwohl es ebenfalls wasserähnlich in der Struktur ist. Der Hauptgrund hierfür dürfte seine stärkere Toxizität sein ( vergl. NASH, 1966).

So berichteten REBHUN und SANDER (1966) von einer Volumenänderung der Zellen und eines Teils ihrer Organellen, wenn Äthylenglycol als Gefrierschutzmittel verwendet wurde.

Wesentlich rascher als die bisher erwähnten Frostschutzmittel vermag Dimethylsulphoxyd ( DMSO) die Barriere der Cytoplasmamembran zu überwinden, obwohl es im Gegensatz zu Glycerin kaum Ähnlichkeit mit Verbindungen des Zellstoffwechsels hat (LOVELOCK und BISHOP, 1959).

Allerdings scheint DMSO in gleicher Konzentration wie Glycerin toxischer zu sein, wie von PORTERFIELD und ASHWOOD-SMITH (1962) an embryonalen Hühnerfibrolasten nachgewiesen wurde. Da aber die für den Schutz notwendige Konzentration geringer als bei Glycerin sein kann, und vor allem auf Grund seiner raschen Penetration in die Zelle, ist DMSO ein weit verbreitetes Gefrierschutzmittel geworden ( vergl. MERYMAN, 1966).

Eine Reihe anderer Gefrierschutzmittel, wie Pyridin-N-oxyd ( NASH, 1961), Diaethylenglycol, Propylenglycol( VOS und KAALEN, 1965 ) sowie Dimethylacetamid für Zellen mit einem hohen Lipidanteil in der Zellmembran (NASH, 1962), haben nur eine geringe Verbreitung gefunden. Anders als die bisher erwähnten Gefrierschutzmittel müssen polymere viskose Verbindungen ihre Schutzwirkung entfalten, da sie ja auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes nicht in die Zelle einzudringen vermögen.

Vor allem das von BRICKA und BESSIS (1955) beschriebene Polyvinylpyrrolidin (PVP) sowie das Polyaethylenglycol (SLOVITER, 1962) sind als polymere Schutzmittel bekannt. Worin ihre Schutzwirkung besteht, ist nicht sicher bekannt. MAZUR (1960) vermutete, daß sie das Festsetzen von unterkühltem Wasser an der Innenseite der Zellmembran verhindern können. Ganz allgemein nahm NAS (1962) an, daß die extrazellulären Polymere die Zelle umhüllen und deren Membranen vor Denaturation schützen.

Die Zahl der Gefrierschutz-Untersuchungen an pflanzlichem Material ist weit geringer. Ausgehend von der Beobachtung, daß bei frostresistenten Zellen der Zuckergehalt im Plasma gegenüber normalen Zellen erhöht sein kann, testete SAKAI (1960) den Einfluß von Glucose, Saccharose, Maltose und Xylose auf die Frosthärte von Gardenia-Zweigen und konnte feststellen, daß gleichzeitig mit dem Anwachsen des osmotischen Druckes innerhalb der Zellen die Frosthärte bedeutend erhöht wurde. Einen ähnlichen Effekt wie die Zucker zeigten Glycerin, Acetamide, Aethylenglycol und Mannitol. Auch Salzlösungen, vor allem Kationen, sollen nach TERUMOTO (1959) eine frostschützende Wirkung bei Grünalgen ausüben. Die Ergebnisse der Gefrierschutzversuche bei dieser Grünalge waren ähnlich denen, die an tierischen Organismen erhalten wurden (TERUMOTO, 1960).

Allen bisher erwähnten Untersuchungen liegt ein langsames Einfrieren mit Dehydratation durch extrazelluläre Eisbildung zugrunde. Bei der dabei stattfindenden Entwässerung ändert sich nicht nur der physiologische Zustand, sondern auch das morphologische Bild ist völlig abgewandelt, wie MOOR (1964) elektronenmikroskopisch an Hefezellen nachweisen konnte.

Damit ist dieses Einfrierverfahren für unsere Fragestellung ungeeignet, weil die Zellstrukturen weitgehend verändert werden.

Allein der zweite Weg, ein rasches Einfrieren, ist in der Lage, die Zellen mittels Vitrifikation in einem, wenn überhaupt, nur geringfügig veränderten Zustand zu erhalten. Um eine Vitrifikation zu bewirken, müßte die Gefriergeschwindigkeit mehr als 1000° C/sec ; bei stark wasserhaltigen Zellen etwa 10 000° C/sec betragen, damit der Rekristallisationspunkt erreicht ist, bevor das Zellwasser kristallisiert ( vergl. MOOR, 1964 ).

Diese Gefriergeschwindigkeiten können mit flüssigem Helium II erreicht werden, da diese flüssige Zustandsform des Gases nur wenig über dem absoluten Nullpunkt liegt und zudem noch besondere Eigenschaften, wie z.B. Superleitfähigkeit, aufweist ( FERNANDEZ-MORAN, 1960 ).
Die Anwendung von He II erfordert jedoch einen erheblichen apparativen und damit auch finanziellen Aufwand, so daß diese Methode für die Gefrierätzung, abgesehen von einer Ausnahme ( MOOR und MÜHLETHALER, 1963 ) bisher nicht verwendet wurde.

Ungünstiger als in He II ist das Eintauchen der Objekte in flüssige Luft oder Stickstoff, da bei der Berührung des warmen Körpers mit dem flüssigen tiefsiedenden Gas ein das Objekt umhüllender Gasmantel den Wärmeausgleich zwischen dem einzufrierenden Körper und dem flüssigen Gas verhindert ( Leidenfrost'sches Phänomen).

Um die dabei entstehende Verzögerung der Abkühlung, die zu Gefrierschäden im Objekt führen kann, zu umgehen, wurden als Kontaktmedien wesentlich höher siedende Gase, wie z.B. Freon 22 ( Fluor-dichlormethan) eingeführt, die mit flüssigem Stickstoff ( - 196° C ) gekühlt werden können. Die Einfriertemperatur beträgt im Falle des Freon 22 etwa - 150° C . Die dabei auftretende Gefriergeschwindigkeit von etwa 100° C/sec ist allerdings für eine Vitrifikation der meisten Untersuchungsobjekte zu gering, so daß geeignete Gefrierschutzmittel eingeführt werden müssen.

Das Einführen der Frostschutzmittel in die Zelle stellt jedoch häufig ein großes Problem dar. Das scheint besonders für die Zellen von höheren Pflanzen zuzutreffen. So gelang die Imbibition mit Glycerin bei Zwiebelwurzeln nur, wenn diese von Beginn an in einer Lösung von 20 % Glycerin wuchsen ( BRANTON und MOOR , 1964 ).

Ungelöst ist bisher das Problem, wie ein Gefrierschutz von grünen und ausdifferenzierten Geweben erreicht werden kann. Weiterhin war es von Interesse, wie sich verschiedene Organismen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Gefrierschutzmittel und Einfrieren verhalten. Hierbei sollten die Membransysteme der Zelle im Mittelpunkt des Interesses stehen.

## Die Ultrastruktur von Membransystemen in der Zelle

### Plasten

#### Der photosynthetische Apparat

#### Lichtmikroskopische Untersuchungen an Chloroplasten

Die Bedeutung des Pigments in den grünen Pflanzen in Verbindung mit der $CO_2$-Assimilation wurde zuerst von INGEN-HOUSZ (1779) erkannt, indem er nachwies, daß grüne Pflanzen in der Lage sind, sauerstoffarme in sauerstoffreiche Luft umzuwandeln. Mit Hilfe des Lichtmikroskopes konnte dann festgestellt werden, daß dieses grüne Pigment in Chloroplasten lokalisiert ist. Offenbar war es innerhalb der Chloroplasten an das Auftreten von "körnigen " Strukturen gebunden, die von MEYER (1883) als Grana bezeichnet wurden. Erst sehr viel später konnte HEITZ (1936) die Grana als parallel angeordnete Scheibchen identifizieren.

Durch die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes war das Eindringen in kleinere Baueinheiten der Chloroplasten nicht möglich.

#### Chemische Analyse von Chloroplasten

Weitere wichtige Einzelheiten zur Aufklärung der Struktur des photosynthetischen Apparates lieferte die chemische Analyse, mit deren Hilfe es zum Teil gelang, eine Beziehung zwischen Struktur und Funktion herzustellen. Die chemischen Untersuchungen ergaben eine Zusammensetzung aus 50 % Protein und 33 % Lipiden, bezogen auf das Trockengewicht der Chloroplasten (MENKE, 1938) und für das lamellare System Proteine und Lipide in etwa dem gleichen Verhältnis ( vergl. WEIER et al., 1966). Nach Extraktion der Lipide und löslichen Proteine blieb ein Rest, das sogenannte Strukturproteid, übrig. Die Analyse dieses Strukturproteids offenbarte eine auffallende Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung auch von verwandschaftlich ferner stehenden Pflanzen (WEBER, 1963). Die Zusammensetzung der Lipide war offensichtlich weniger einheitlich (vergl. FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER, 1965). Der grüne Farbstoff soll sich zu etwa 75 % aus Chlorophyll a und zu etwa 25 % aus Chlorophyll b zusammensetzen (vergl. SITTE, 1965). Daneben konnten Karotinoide, ATP (ARNON, 1955), DPN (DAVENPORT, 1952), Cytochrom f und Vitamine ( LUNDEGÅRDH ,1961) nachgewiesen werden.

Die chemischen Untersuchungen erbrachten also das Bild eines Organells, das strukturell im wesentlichen aus Lipiden und Proteinen aufgebaut ist und durch den Besitz von Energieträgern ( ATP) sowie Enzymen offenbar besondere physiologische Aufgaben wahrnehmen kann.

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Feinstruktur des Organells ergaben Untersuchungen von MENKE und MENKE (1956). Dabei konnte mit Hilfe volumetrischer Messungen festgestellt werden, daß nach Herauslösen der Lipide die Dicke der Chloroplasten um etwa die Hälfte abnimmt, der Durchmesser jedoch erhalten bleibt. Hieraus kann geschlossen werden, daß Lipide und Proteine in getrennten Schichten angeordnet sind, denn beim Vorliegen gemischter Schichten müßte auch der Durchmesser abnehmen.

Physikalische Methoden zur Aufklärung der Chloroplasten

Der lamellare Bau ließ sich auf Grund der physikalischen Eigenschaften der Chloroplasten rekonstruieren. So zeigte die Analyse der Form - doppelbrechung im Polarisationsmikroskop, daß in den Chloroplasten sublichtmikroskopische Lamellen vorhanden sein müssen ( MENKE, 1934); Für die Existenz von Lamellen sprach auch das Auftreten von Dichroismus. Neben einem Formdichroismus, der von dem lamellaren Bau herrührte, fand RUCH (1957) keinen Hinweis für das Vorhandensein von Eigendichroismus innerhalb der Lamellen. Daraus folgerte er, daß die Proteine in den Lamellen keine bevorzugte Orientierungsrichtung besitzen und wahrscheinlich als kugelige Makromoleküle vorliegen. Dagegen wurde von GOEDHEER (1955) ein innerer Dichroismus beschrieben, der von einer gewissen Orientierung der Chlorophyllmoleküle verursacht werden sollte. Aus der Richtung des inneren Dichroismus leiteten OLSON et al. (1964 a) ab, daß der Oscillator in oder in der Nähe der Chloroplastenlamelle liegt. Allerdings trat der Dichroismus nur bei einer einzigen Absorptionsbande ( C 695 ) auf, so daß angenommen wurde, daß nur ein Teil der Chlorophyllmoleküle orientiert ist (vergl. auch MICHEL-WOLWERTZ und SIRONVAL, 1965). Diese Orientierung des Chlorophylls konnte mit Hilfe von Spektralmessungen der Bifluorescenz an Chloroplasten bestätigt werden (SAUER und CALVIN, 1962 ; OLSON et al. 1964 b).

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Feinbaus der Chloroplasten lieferte die Röntgenstrukturanalyse (KRATKY et al. 1959). Die Auswertung der Meridianreflexe des Röntgenbeugungsdiagramms ergab, daß zwei Lamellen in den Lamellenstapeln symmetrisch zueinander angeordnet sind (KREUTZ, 1963). Auf Grund von Äquatorreflexen in der Ebene der Lamellen wurde postuliert, daß die Proteinpartikel in Form eines Gitters angeordnet sein müssen. Die Analyse der Elektronendichteverteilung führte weiterhin zu der Annahme, daß die Proteinpartikel aus 16 Untereinheiten bestehen. In jeder dieser Untereinheit ( Massezentrum) wurde ein hydrophobes Loch angenommen, in das nach Gestalt und Größe 1 - 2 Porphyrinringe passen ( HOSEMANN und KREUTZ, 1966).

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde also der lamellare Bau des Chloroplasten bestätigt und darüberhinaus eine detaillierte Vorstellung von dem makromolekularen Bau einer solchen Lamelle entwickelt.

## Elektronenmikroskopisch darstellbare Feinstrukturen des photosynthetischen Apparates

### Das Thylakoidsystem

Die von den Lichtmikroskopikern erkannte Granastruktur sowie der mittels physikalischer Methoden identifizierte lamellare Bau der Chloroplasten konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt werden.

Die ersten elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurden an Algen gemacht, wobei übereinstimmend die Chromatophoren durchziehende Lamellen beschrieben werden ( STEINMANN, 1952 ; WOLKEN und PALADE, 1952 ; LEYON, 1954 ; MANTON, 1955). LEYON (1954) erkannte, daß die Lamellen zu je 2 gepaart als Doppellamellen auftreten, und SAGER und PALADE (1954) konnten beobachten, daß diese Doppellamellen an den Enden miteinander verbunden sind und Scheibchen (disc) darstellen. Von STEINMANN und SJÖSTRAND (1955) wurde die gleiche Struktur als "double membran disc " gekennzeichnet. MÜHLETHALER ( 1960 a) nannte sie " Vesikel ". Doch hat sich der von MENKE (1961) vorgeschlagene Begriff " Thylakoid " zur Charakterisierung dieser Scheibchen allgemein durchgesetzt und soll auch hier verwendet werden.

Das Thylakoid muß als membranöser Grundbaustein des photosynthetischen Apparates von den Bakterien bis hin zu den höheren Pflanzen angesehen werden.

Die Bakterienthylakoide sind ebenso wie die der Cyanophyceen nicht in einem besonderen, von einer doppelten Membran umgebenen, Organell, sondern frei im Cytoplasma angeordnet. Innerhalb der bisher untersuchten Bakterien können verschiedene Gruppen hinsichtlich der Anordnung der Thylakoide unterschieden werden. So sind beispielsweise bei Rhodospirillum rubrum und Rhodopseudomonas spheroides die Thylakoide entweder als Bläschen einzeln im Cytoplasma verteilt oder liegen in Form eines Bläschennetzes (Thylakoid-Retikulum) vor ( GIESBRECHT und DREWS, 1962 ; DREWS und GIESBRECHT, 1963 ; COHEN-BAZIRE und KUNIZAWA, 1963), während bei Rhodospirillum molischianum blattartig abgeflachte Thylakoide zu zahlreichen, lockeren Thylakoidstapeln zusammentreten können (GIESBRECHT und DREWS, 1962 ; GIBBS et al., 1965). Den bisher höchsten Ordnungsgrad der Thylakoide in Bakterien erreicht offenbar Rhodospseudomonas viridis ; denn hier sind bis zu 11 Thylakoide zu einem geschlossenen Stapel vereinigt (DREWS und GIESBRECHT, 1965). Ähnlich liegen offenbar die Verhältnisse bei Rhodopseudomonas palustris (COHEN-BAZIRE und SISTROM, 1966, TAUSCHEL und DREWS 1967). Auch bei Cyanophyceen sind individuelle Thylakoide meist verstreut im Cytoplasma enthalten (NIKLOWITZ und DREWS 1956 ; DRAWERT und METZNER-KÜSTER, 1958 ; LEFORT, 1960; HALL und CLAUS, 1963). Doch können auch zwei oder mehr Thylakoide in einem Stapel vereinigt sein (JOST, 1965).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Prokaryonten sind bei allen photosynthetisch aktiven Eukaryonten die Thylakoide in einem besonderen Organell angeordnet, das von einer doppelten Membran umgrenzt wird.

In Algenchromatophoren bilden die Thylakoide meist charakteristische Membranstapel, die von HEITZ (1961 ) als Dünn-Dick-Muster der Lamellen beschrieben wurden. Nach UEDA (1961), GIBBS (1962) sowie GREENWOOD (1964) kann die Zahl der an einem solchen Membranstapel beteiligten Thylakoide in einem gewissen Zusammenhang zur phylogenetischen Stellung der betreffenden Algenfamilie gebracht werden. Membranstapel, die bei Chlorella auftraten, wurden von MURAKAMI et al. ( 1965) als Pseudograna beschrieben. Doch scheinen schon innerhalb der Klasse der Algen echte Grana vorzukommen ( KAJA, 1966).
Im Vergleich zu den Algen sind die Chloroplasten höher entwickelter Pflanzen stets durch das Auftreten von Grana charakterisiert.

Matrix und Einschlüsse

Die Thylakoide, die den Ort der photosynthetischen Aktivität darstellen, sind in eine Matrix ( Stroma) eingebettet. Im Stroma kann die transitorische Assimilationsstärke und sogenannte osmiophile Globuli auftreten, die auf Grund ihres hohen Lipidgehaltes mit der Vermehrung der Thylakoide in Verbindung gebracht wurden ( v. WETTSTEIN, 1959 ; GREENWOOD et al, 1963 ; LICHTENTHALER und SPREY, 1966).

Außerdem wurde im Stroma eine kristalline Struktur beschrieben (SCHNEPF, 1961 ; PERNER, 1962), die später nach Glutaraldehyfixierung als Phytoferritin, eine an hochmolekulares Protein gebundene Eisenreserve, identifiziert wurde ( HYDE et al, 1963).

Von besonderer Bedeutung war der Nachweis von DNS und RNS im Stroma, denn damit fand die Kontinuitätstheorie, die von MEYER ( 1883 ) und SCHIMPER (1885 ) begründet worden war, sowie auch der semi-autonome Erbgang der Plastiden, eine molekularbiologische Erklärung.
Das Vorkommen der DNS konnte sowohl durch biochemische Untersuchungen ( BRAWERMANN und EISENSTADT, 1964 ; BALTUS und BRACHET, 1963 ; RUPPEL und van WYK, 1965 ) als auch durch Autoradiographie im Dünnschnitt ( LIMA de FARIA und MOSES, 1965 ; BUDD und MILLS, 1965 ) nachgewiesen werden. Darüberhinaus gelang es, die DNS-Fibrillen direkt im Elektronenmikroskop darzustellen ( RIS und PLAUT, 1962 ; SPREY, 1966 ; BISALPUTRA und BISALPUTRA, 1967 ). Der direkte Einbau von markierten Aminosäuren führte zu der Annahme, daß sich auch in Chloroplasten Ribosomen befinden ( HEBER, 1962 ; EISENSTADT und BRAWERMANN, 1963). Sie scheinen dem Typ nach nicht mit den Cytoplasmaribosomen ( 80 s-Typ ) identisch zu sein (SVETAILO et al., 1967), da es sich stets um 70 s-Ribosomen handelt, die bisher nur bei Bakterien nachgewiesen wurden.

Auf Grund der bisher erwähnten Befunde stellt sich der Chloroplast als ein semi-autonomes Organell dar, das durch eine doppelte Hüllmembran vom Cytoplasma abgegrenzt ist und im Inneren aus einem Stroma mit verschiedenen Einschlüssen besteht, in welches das Membransystem eingebettet ist.

Makromolekularer Bau der Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran erschien nach Anwendung der Permanganat- und Osmiumfixierung zunächst als dreischichtig ( HODGE et al., 1955 ). Nachdem diese Dreischichtigkeit auch an anderen Cytomembranen bestätigt wurde, erhob ROBERTSON (1960) diese Struktur zu einem allgemeinen Bauprinzip der Membranen. Er nannte sie generalisierend unit-membrane. Die Angaben über die Dicke der Thylakoidmembran schwanken. Von STEINMANN und SJÖSTRAND ( 1955 ) wurde sie mit 65Å, von HODGE ( 1959 ) mit 70 Å, von WOLKEN ( 1958 ) mit 100 Å, von MÜHLETHALER ( 1960 ) mit 75 Å und von HESLOP-HARRISON ( 1963 ) mit 50 Å angegeben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen neuerer Zeit mit Hilfe verbesserter Fixierungstechnik ergaben, daß das einfache Bild einer dreischichtigen unit-membrane für die Thylakoidmembran nicht zutrifft. So verglich WEIER ( 1963 ) partikuläre Strukturen in den Membranen von Dünnschnitten mit den von CALVIN ( 1959 ) postulierten Quantasomen, die die kleinstmögliche Einheit für die Photosynthese darstellen sollen. Von UEDA ( 1964 ) wurde die Form dieser Partikel als drei- und rechteckig, trapezförmig oder sphärisch beschrieben. Eine einheitlichere Form der Partikel auf der Thylakoidmembran nahm MURAKAMI ( 1964 ) an. Detaillierte Angaben über den Bau dieser Partikel stammen von HOHL und HEPTON ( 1965 ), wonach die globulären Untereinheiten einen Durchmesser von 75 Å aufweisen und aus einem elektronentransparenten Hof, umgeben von einem elektronendichten Ring, bestehen ( vergl. auch WEIER und BENSON , 1967 ). Die globulären Untereinheiten wurden von MENKE ( 1965 ) der Proteinschicht zugeordnet.

Über die Anordnung der Partikel auf der Thylakoidmembran kann naturgemäß mit Hilfe der Dünnschnitt- Technik kaum etwas ausgesagt werden.

Erst nach Einführung der Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure ( PWS ) ließen sich die Partikel auf den isolierten Thylakoidmembranen als helle periodische Strukturen darstellen. Von MURAKAMI ( 1964 ) wurden zwei Typen von Partikeln mit 60 - 80 Å bzw. 40 - 50 Å Durchmesser beschrieben. Dagegen konnten ODA und HUZISIGE ( 1964 ) nur einen Typ mit 60 - 80Å Durchmesser identifizieren. Die partikulären Baueinheiten konnten auch nach Negativkontrastierung isolierter Bakterienthylakoide nachgewiesen werden ( LÖW und AFZELIUS , 1964 ; HOLT und MARR , 1965 ; GIESBRECHT und DREWS , 1966 ).

Gitterartige Strukturen wurden auch nach Bedanpfung isolierter Thylakoide erhalten ( PARK und PON , 1961 ; GIESBRECHT und DREWS , 1966 ; MENKE, 1966 ). Nach PARK und BIGGINS ( 1964 ) sollen die periodisch angeordneten Partikel den Quantasomen entsprechen und aus 4 Untereinheiten aufgebaut sein ( vergl. PARK, 1965).

Alle bisher erwähnten elektronenmikroskopischen Präparationsverfahren gingen entweder von fixierten und eingebetteten Zellen ( Dünnschnitt- Technik ) oder von isolierten, angetrockneten Zellen ( Negativkontrastierung, Bedampfungstechnik ) aus. Durch die Einführung einer neuen Technik, der Gefrierätzung, konnten auch erstmalig latent lebende Zellen elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Mit Hilfe dieses neuen Verfahrens bestimmten GIESBRECHT und DREWS ( 1966 ) die Dicke eines Bakterienthylakoids mit etwa 200 Å. Bei höherer Auflösung konnte eine dreischichtig erscheinende 40 - 50 Å dicke Trägermembran identifiziert werden. In Flächenbrüchen ließ sich ein rhombisches Schichtgitter und hexagonal angeordnete Granula unterscheiden. Dieser eindeutig kristalline Aufbau der Thylakoidmembran konnte bisher in keinem anderen Objekt mit Hilfe der Gefrierätztechnik nachgewiesen werden.

Die Thylakoidmembran in der Blaualge Oscillatoria, die ebenfalls zu den Prokaryonten gehört, soll nach JOST ( 1965 ) aus drei Komponenten aufgebaut sein : einer homogenen Trägermembran, auf deren Außenseite 50 - 70 Å große Partikel und auf deren Innenseite 100 - 200 Å große Partikel lokalisiert sind. Die großen Partikel sollen mit den von PARK und PON ( 1963 ) beschriebenen Quantasomen identisch sein.

Ähnliche Befunde erhielt STAEHELIN ( 1966 ) an Chlorella. Die großen Partikel ( 120 Å ) befanden sich jedoch nach STAEHELINS Interpretation auf der Thylakoidaußenseite in lockerer Anordnung, während die Innenseite von dicht angeordneten kleinen Partikeln ( 60 Å ) bedeckt sein soll. Diese Auffassung über den Bau der Thylakoidmembran stimmt überein mit der von MÜHLETHALER et al. (1965 ). Die Autoren unterscheiden drei Baueinheiten der Thylakoidmembran:

1.) eine zentrale Schicht ( 40 Å ), die aus Lipiden bestehen soll,
2.) auf der Innenseite der Trägermembran Partikel mit einem Durchmesser von 60 Å und
3.) auf der Außenseite Aggregation der 60 Å-Partikel zu Vierergruppen, die als Multienzymkomplexe bezeichnet wurden. Die zentrale Lipidschicht soll perforiert sein, so daß die beiden Partikeltypen miteinander in Kontakt stehen.

Zu einer wesentlich anderen Interpretation des makromolekularen Baues der Thylakoidmembran von höheren Pflanzen gelangten BRANTON und PARK ( 1967) auf Grund ihrer anderen Auffassung über die Lage der Brüche. Sie nahmen an, daß die Brüche in die Membran hinein erfolgen und damit auch die partikulären Thylakoidoberflächen dem Membraninneren zuzuordnen sind. Nach ihren Befunden soll die Außenfläche der Thylakoide glatt sein, während im Inneren große Partikel ( 175 Å ) als Quantasomen in eine körnige Matrix ( 90 Å-Partikel ) eingebettet sind.

Alle Untersuchungen an Thylakoidmembranen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens erbrachten den Nachweis, daß die photosynthetisch aktiven Membranen partikulär aufgebaut sind. Bisher ist jedoch die Frage offen, ob phylogenetisch bedingte Unterschiede im makromolekularen Bau der Thylakoidmembran existieren.

## Mitochondrien

Ebenso wie die Chloroplasten werden auch die Mitochondrien zu den semi-autonomen Organellen innerhalb der Zelle gerechnet.

Die von BENDA (1898) als Mitochondrien bezeichneten fädigen oder granulaartigen Strukturen in der Zelle konnten nur mit Fixierungsmitteln dargestellt werden, durch die die Lipoide stabilisiert werden.

Diese Mitochondrien erwiesen sich mit der von WARBURG ( 1913) beschriebenen Partikelfraktion identisch, die für die Atmung der Zelle zuständig sein sollte.

Weiterhin ergaben chemische Untersuchungen von isolierten Mitochondrien, daß sie etwa zu gleichen Teilen aus Lipiden und Proteinen bestehen ( HOGEBOOM et al., 1947 ; STAFFORD, 1951). Der Gehalt an Phospholipiden, die allgemein als Membranbildner bekannt sind, ließ auf Grund der chemischen Untersuchungen die Vermutung zu, daß die Mitochondrien membranöse Organellen sind.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte der postulierte membranöse Bau der Mitochondrien bestätigt werden. Danach ist ein Mitochondrion von einer doppelten Hüllmembran umgeben. Zwischen der äußeren und der inneren Membran befindet sich ein perimitochondrialer Spaltraum, der im Unterschied zu dem Binnenraum mit einer wässrigen Phase gefüllt sein soll. Dieser Bau deutet darauf hin, daß innerhalb des Mitochondrion zwei Kompartimente zu unterscheiden sind. Von der inneren Membran ragen taschen-, röhren- oder scheibchenförmige Falten in das innere Chondrioplasma ( Matrix des Mitochondrions) hinein. Je nach Gestalt der von der inneren Membran gebildeten Invaginationen in das innere Chondrioplasma spricht man von Christae, Tubuli oder Sacculi.

Nach den bisherigen Befunden scheinen die Mitochondrien von tierischen Organismen sowie von einigen Pilzen zu demCristae-Typ zu gehören, während die von Protisten und höheren Pflanzen zu dem Tubuli - oder Sacculi - Typ gerechnet werden müssen (NOVIKOFF, 1961 ; SITTE, 1961).

Offenbar können aber auch in höheren Pflanzen Mitochondrien mit Cristae ausgebildet werden (BUVAT, 1958b ; LANCE, 1958) . Es ist deshalb anzunehmen, daß die verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen der inneren Mitochondrienmembranen eher Besonderheiten des Stoffwechsels als taxonomische Unterschiede widerspiegeln ( vergl. FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER, 1965).

Der Bau der Mitochondrienmembranen wurde zunächst als unit-membrane im Sinne von ROBERTSON (1960) aufgefaßt. Späterhin konnte jedoch die makromolekulare Architektur der Mitochondrienmembranen mit Hilfe der Negativfärbung als partikulär aufgeklärt werden. Danach schienen die inneren Membranflächen von pilzartigen Partikeln besetzt (FERNANDEZ-MORAN, 1963 ; STOECKENIUS, 1963). Da diese Partikel in Dünnschnitten zunächst nicht nachgewiesen werden konnten, wurden sie z.T. als Präparationsartefakte angesehen ( SJÖSTRAND et al., 1964) . Nachdem ihr Vorkommen jedoch auch mit Hilfe der Gefrierätztechnik bestätigt wurde ( MOOR et al., 1964), dürften heute kaum Zweifel an ihrer Existenz bestehen.

Da nach LEHNINGER (1966) die meisten Enzyme nicht diffus im Cytoplasma vorkommen, sondern in oder an Membranen gebunden , wird vom Funktionellen her die Struktur der Mitochondrien verständlich.

Durch die vielfachen Invaginationen entstehen große Oberflächen mit hoher enzymatischer Wirksamkeit. Die Enzyme sollen nach CHANCE et al, (1963) hypothetisch in besonderen Orten, sogenannten Oxysomen, lokalisiert sein. Deshalb lag es nahe anzunehmen, daß die mit Hilfe der Negativfärbung und Gefrierätzung nachgewiesenen Partikel mit diesen Oxysomen identisch sind. Durch Kombinierung biochemischer Präparationsmethoden mit der Negativfärbung wurde die Natur der pilzartigen Elementarpartikel weitgehend aufgeklärt. Nach FERNANDEZ-MORAN et al. (1964) sollen die Elementarpartikel den vollen Satz von Enzymen der Atmungskette in geordneter Lagerung zusammen mit Lipoid enthalten. Von diesen Autoren wurde angenommen, daß von den Partikeln der Elektronentransport durchgeführt werden kann. Sehr weitgehende Analysen über die Funktionsstruktur der inneren Mitochondrienmembran liegen von ODA et al (1965) sowie von ODA und SEKI (1966) vor. Den japanischen Autoren gelang es, verschiedenen Membranstrukturen bestimmte Enzyme zuzuordnen. So sollen in den Basisplatten der Elementarpartikel die Cytochrome,in dem Kopf die ATPase lokalisiert sein.

Neben der Funktion der Zellatmung kommen den Mitochondrien wahrscheinlich auch noch andere Fähigkeiten zu. So wurde von verschiedenen Autoren ein Einbau von markierten Aminosäuren in Eiweiß innerhalb der Mitochondrien beschrieben (MC LEAN et al, 1958 ; CHATTERJEE et al., ( 1966 ) .

Sehr bedeutsam erscheint vor allem der sowohl biochemische als auch elektronenmikroskopische Nachweis von DNS in Mitochondrien ( NASS und NASS, 1963 ; CHATTERJEE et al., 1966). Ist dies doch eine Stütze für die Annahme der genetischen Kontinuität der Mitochondrien ( LUCK, 1966). Von einigen Autoren ( u.a. BELL und MÜHLETHALER, 1964 ) wurde jedoch eine de novo-Genese der Mitochondrien angenommen. An verwandschaftlich nahestehenden Objekten konnte dies jedoch nicht bestätigt werden ( vergl. DIERS, 1964 ).

Ganz allgemein läßt sich feststellen, daß die Mitochondrien einige Baueigentümlichkeiten mit den Plastiden gemeinsam haben. So besitzen beide Organellen ein inneres und ein äußeres Membransystem sowie DNS und RNS. Weiterhin scheint bei beiden Organellen das innere Membransystem partikulär aufgebaut zu sein.

Neben den Plasten (Chloroplasten, Mitochondrien ), die u.a. auf Grund ihres spezifischen DNS-Gehaltes offenbar eine relativ autonome Stellung innerhalb der Zelle einnehmen, existieren noch eine Reihe von Plasmamembranen oder Membransystemen, die sich in mancher Beziehung von den Plasten unterscheiden.

## Plasmamembranen

### Kernmembran

#### Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kernhülle

Schon vor Einführung der Elektronenmikroskopie in die Ultrastrukturforschung war mit Hilfe indirekter Methoden die Existenz einer den Kern umhüllenden Membran postuliert worden. So stießen CHAMBERS und FELL ( 1931 ) auf Widerstand, wenn sie beim Präparieren mit einer feinen Nadel den Kern berührten. Daraus schlossen sie, daß der Kern durch eine Hülle vom Cytoplasma abgegrenzt sein muß. Zum gleichen Ergebnis gelangte SCHMIDT (1939), der eine optisch negative sphäritische Textur in der Grenzschicht des Kerns nachwies ( lamellare Doppelbrechung). Auch FREY-WYSSLING (1953) konnte bei Untersuchungen an lebenden Zellen durch Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie die Anwesenheit einer Membran zwischen Kern und Cytoplasma feststellen. Der erste Hinweis, daß die Kernmembran perforiert ist, stammt von SCOTT ( 1950 ). Er nannte die zwischen Kern und Cytoplasma bestehenden Verbindungen " nucleodesmata".

#### Feinstruktur der Kernmembran im Elektronenmikroskop

Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes ließ sich die Existenz einer besonders differenzierten Kernmembran bestätigen. Die ersten Befunde stammen von bedampften, isolierten Kernhüllen. So unterschieden CALLAN und TOMLIN ( 1950 ) an isolierten Kernhüllen von Amphibien zwei Schichten:

eine mit Poren versehene äußere und eine porenlose innere Schicht. In genau umgekehrter Anordnung postulierten BAIRATI und LEHMANN ( 1952) die beiden Schichten am gleichen Objekt.

Erst von PAPPAS ( 1956) wurde mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik demonstriert, daß bei Amoeba beide Membranen der Kernhülle in bestimmten Abständen miteinander verschmelzen und Poren bilden. In einigen Fällen konnte eine diaphragmaähnliche Struktur festgestellt werden, die die Porenöffnung verschließen soll. Unter der inneren Kernmembran ließ sich eine dicke Schicht von hexagonal angeordneten Prismen, in deren Mitte der Porenkanal verlaufen soll, nachweisen ( PAPPAS, 1956 ; ROTH et al., 1960). Ein ähnlicher Bau der Kernhülle wurde auch von Gregarinen beschrieben ( BEAMS et al., 1957).

Bei anderen Einzellern, den Dinoflagellaten, konnte zunächst mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik eine Kernhülle nicht eindeutig nachgewiesen werden ( GRELL und WOHLFAHRT-BOTTERMANN, 1957). Nach Verfeinerung der Fixierungs- und Einbettungsmethoden wurde jedoch auch bei Dinoflagellaten eine Kernhülle identifiziert ( GIESBRECHT, 1965 ; LEADBEATER und DODGE, 1967). Eine Besonderheit im Bau der Kernhülle zeigt offenbar Noctiluca, die meist zu den Dinoflagellaten gerechnet wird. Bei diesem Organismus soll zwischen Nucleolarmaterial und Cytoplasma eine Schicht von Vesikeln liegen, die die porenlose Kernmembran durchbrechen können. Offensichtlich stehen die Bläschen im Dienste des Transportes von Kernmaterial in das Cytoplasma (AFZELIUS, 1963).

Das Bild der doppelten Kernmembran, die von Poren durchbrochen wird, bestätigten BAHR und BEERMANN ( 1954) an Speicheldrüsenkernen von Chironomus. Sie fanden, daß die Zahl der Poren nicht nur absolut, sondern auch relativ größer ist als bei normalen Zellen. Hieran läßt sich eine Beziehung von Struktur und physiologischer Aktivität der Speicheldrüsenzellen ableiten. Für die Poren der Speicheldrüsenkerne von Drosophila machte GAY ( 1956) detaillierte Angaben. Sie wurden als rund, hexagonal und pentagonal beschrieben und sollen im Zentrum häufig Granula, Fibrillen und in bestimmten Larvenstadien Tropfen aufweisen. Die Tropfen werden als austretendes Kernmaterial gedeutet.

In Oocytenkernen von Schnecken konnten von SWIFT ( 1956) sogenannte " annulate lamellae " nachgewiesen werden. Diese Strukturen sind im Cytoplasma lokalisiert, sind aber, der Kernmembran sehr ähnlich, mit Poren versehen. Daher wurde erwogen, daß die annulate lamellae von derKernhülle abstammen und bei der Übertragung der Information eine Rolle spielen. Die Existenz dieser Struktur scheint im wesentlichen auf Oocytenkerne und Spermatidenkerne beschränkt zu sein ( KING und DEVINE, 1958 ; MAHOWALD, 1962 ; BALINSKY und DEVIS, 1963 ; KESSEL, 1965). Selten wird ihr Vorkommen bei Tumorzellen (WESSEL und BERNHARD, 1957 , BINGELI, 1959) erwähnt.

Die auf tangential angeschnittenen Kernmembranen erscheinenden ringförmigen Strukturen bezeichnete AFZELIUS ( 1955) synonym zu Pore als Annulus, ein Begriff, der in der Literatur häufig verwendet wird. Nach WATSON ( 1955) soll der Annulus die Oberflächenansicht der Pore darstellen. Pore und Annulus sind demnach Begriffe für verschiedene Ansichten ein und derselben Struktur. Anderer Auffassung ist GALL ( 1967 ), der annahm, daß Annuli und Poren keine identischen Strukturen sind. In den Annuli hatte GALL ( 1954 ) 8 Partikel in den Poren von Kernhüllen der Amphibienoocyten beschrieben, die wahrscheinlich mit den von POLLISTER et al. ( 1954) erwähnten fadenähnlichen Gebilden in Poren identisch sind. Nach WISCHNITZER ( 1958) sollen die Annuli aus je 8 Subannuli bestehen, die einer octogonalen Symmetrie des Porenkomplexes zugrunde liegen. Die gleiche Symmetrieordnung postulierte GALL ( 1967 ) für die Poren der Kernhüllen von Triturus.

Eine relativ große Zahl von Befunden liegt über den Bau der Kernhülle von Mammalia vor. WATSON ( 1954) machte zum ersten Mal quantitative Angaben über die Verteilung der Poren auf der Kernhülle. Demnach sollen etwa 10 000 Poren die Hülle eines Kerns der Pankreaszellen durchbrechen. Das entspräche 10 - 15 % der Kernoberfläche. Dagegen schätzten BARNES und DAVIS ( 1959) die Zahl der Poren pro Kernhülle bei Mausleberzellen auf 800 ( = 3 % der Kernoberfläche). Nach AFZELIUS ( 1966 ) gibt die Zahl der Poren einen deutlichen Hinweis auf die physiologische Aktivität der Zelle. In unreifen Seeigeleiern fand er eine ungewöhnlich hohe Zahl von Poren ( 80 / $\mu^2$ ), während in reifen Eiern, die sich in einem Zustand der relativen Ruhe befinden, die Zahl der Poren nicht von der normaler somatischer Zellen unterschieden werden kann.

Nach den bisher vorliegenden Befunden ist kaum ein Unterschied im Bau der Kernhülle zwischen tierischen und pflanzlichen Organismen zu erkennen.

In Pilzen soll ähnlich wie bei Dinoflagellaten die Kernhülle während der Mitose erhalten bleiben ( ROBINOW und BAKERSPIEGEL, 1965). Das Gleiche gilt offenbar auch für Hefen ( ROBINOW und MARAK, 1966). An Hefen wurde auch erstmalig die Methode der Gefrierätzung angewendet ( MOOR und MÜHLETHALER, 1963). Mit Hilfe dieses neuen Verfahrens sind quantitative Aussagen über die Verteilung der Poren auf der Kernoberfläche möglich. Die Autoren schätzten, daß etwa 6-8 % der Kernhülle von Poren eingenommen wird. Die absolute Zahl der Poren pro Kernoberfläche soll 200 betragen. In alten Zellen können die Poren auf bestimmte Bezirke der Kernhülle beschränkt sein. Für die Existenz von Annuli fanden sich keine Hinweise.

In Acetabularia, die mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik untersucht wurde, ließen sich jedoch Annuli nachweisen ( WERZ, 1964). Die Annuli sollen die eigentliche Pore umgeben. Innerhalb der Pore wurden 7-9 Granula beschrieben. Ähnliches berichteten YOO und BAYLEY ( 1967) von Kernporen der Erbsenkeimlinge, die mit Hilfe des Negativkontrastverfahrens untersucht wurden. Die Poren sollen hier aus 1-3 Granula oder Tubuli aufgebaut sein und von einem Annulus umgeben sein. Der Annulus seinerseits setzt sich aus 8 Subannuli zusammen. Diesem Bau der Pore läge also eine ähnliche Symmetrie zugrunde, wie sie von tierischen Zellen beschrieben wurde ( vergl. GALL, 1967).

Der Bau der Kernhülle ist demnach bei tierischen und pflanzlichen Zellen der verschiedensten Verwandschaftsgruppen ähnlich: eine Doppelmembran ist in bestimmten Intervallen von Poren durchbrochen.

Nicht nur der Bau, auch die Genese der Kernhülle scheint einheitlich zu sein, denn oftmals konnte eine enge Beziehung zum endoplasmatischen Reticulum nachgewiesen werden.

So beobachtete WATSON ( 1955) Verbindungen des endoplasmatischen Reticulums ( ER) mit der Kernhülle und folgerte daraus, daß die Kernmembran morphologischer Teil des ER ist. Im Gegensatz dazu vertrat MILLER ( 1959 ) die Auffassung, daß das ER an der Kernhülle gebildet wird und sich dann in das Cytoplasma verlagert. Eine Bestätigung für die enge Verwandschaft von ER und Kernhülle lieferten Untersuchungen über die Mitose von HeLa-Zellen ( ROBBINS und GONATAS, 1964). Während der Prophase löst sich die Kernhülle in ER-ähnliche glatte Membranen auf, die vor allem an der Peripherie der Zelle zahlreich auftreten. Die Neubildung der Kernhülle erfolgt in der Anaphase zunächst an der Oberfläche der Chromosomen ( vergl. auch HARRIS, 1961; STEVENS, 1965 ; FELDHERR, 1966). Dann treten die ER-ähnlichen Elemente zur späteren Kernhülle zusammen. In der Telophase wird dieser Vorgang abgeschlossen.

Eine Kontinuität des ER mit der Kernmembran wurde auch für pflanzliche Organismen nachgewiesen. So beschrieben LANG ( 1963 ) für Volvocaceae und MC ALEAR und EDWARDS ( 1959) für Deuteromyceten Verbindungen des ER mit der Kernhülle. Darüberhinaus konnten auch Kontakte des Endomembranensystems mit der Cytoplasmamembran beobachtet werden, so daß eine enge Verwandschaft von ER, Kernhülle und Cytoplasmamembran postuliert wurde ( LANCE, 1957 ; MC ALEAR und EDWARDS, 1959). Auch bei höheren Pflanzen ließen sich Kontakte des ER mit der Kernhülle aufdecken. So gelangten WHALEY et al. (1959) auf Grund ihrer Untersuchungen an Maiswurzelzellen zu der Auffassung, daß die Kernhülle einen Teil des ER darstellt. Diese Annahme wurde durch Befunde an Zwiebelwurzelzellen gestützt ( PORTER und MACHADO, 1960). Ähnlich wie bei tierischen Organismen ergab die Analyse der Mi-

tose nämlich, daß die Kernmembran in der Prophase in vesikuläre Elemente zerfällt, die sich von denen des ER nur schwer unterscheiden lassen. In der Telophase sollen diese Vesikel wieder verschmelzen und die neue Kernhülle bilden.

Dieser bisher geschilderte Bau der Kernhülle steht offenbar in einem engen, sinnvollen Zusammenhang mit der Funktion.

In erster Linie stellt die Kernhülle eine Barriere dar, die verhindert, daß Kern- und Cytoplasma sich miteinander vermischen. Damit aber auch z.B. makromolekulare RNS-Moleküle, die die doppelte Membranbarriere nicht passieren könnten, als Informationsträger in das Cytoplasma gelangen, müssen hinreichend große Öffnungen in der Kernhülle ( Poren ) vorhanden sein. Einen eindrucksvollen Nachweis für diese Funktion der Poren stellen die Befunde von FELDHERR ( 1962) dar. Nach Injektion von kolloidalem Gold in das Cytoplasma von Amöben, konnten die Makromoleküle dieses Metalls in Poren und Kernplasma nachgewiesen werden.

Aus den bisher vorliegenden Befunden kann abgeleitet werden, daß die Kernhülle bei allen Organismen, mit Ausnahme von Noctiluca vielleicht, nach einem einheitlichen Bauplan organisiert ist: eine doppelte Kernmembran, die von Poren durchbrochen wird. Ob aber darüberhinaus zwischen verschiedenen systematischen Kategorien gesetzmäßige, phylogenetische Unterschiede im Bau der Kernhülle bestehen, kann nach Auswertung der bis jetzt vorhandenen Informationen nicht gesagt werden.

Während die Kernmembran den Kern vom Cytoplasma abgrenzt, stellt die Cytoplasmamembran ( CM) oder das Plasmalemma die Grenzmembran der gesamten Zelle dar.

## Die Cytoplasmamembran

Die Protoplasten aller Zellen sind von einer Membran, die als Cytoplasmamembran oder als Plasmalemma bezeichnet wird, vom Außenmedium abgegrenzt.

Auf die Existenz dieser Membran wurde zunächst indirekt mit Hilfe chemischer und physikalischer Methoden geschlossen.

Die Beobachtung, daß lipophile Moleküle rascher in die Zelle eindrin gen als hydrophile, führte zu der Annahme, daß eine lipidreiche Grenzschicht den Protoplasten umgibt ( COLLANDER, 1937). Die aus Permeabilitätsversuchen gefolgerte Beteiligung von Lipiden am Aufbau des Plasmalemmas konnte durch GORTER und GRENDEL ( 1925) bestätigt werden, indem sie die Membranlipoide aus Erythrozyten extrahierten und dann auf Wasser spreiteten. Der dabei entstehende monomolekulare Spreitungsfilm nahm eine doppelt so große Oberfläche ein wie die Erythrozytenoberfläche. Aus diesem Befund ließ sich auf die Existenz eines bimolekularen Lipidfilms im Plasmalemma schließen.

Auch die niedrige Dielektrizitätskonstante wies auf den Gehalt an Lipiden hin. Andererseits ergaben die Messungen der Oberflächenspannung, daß keine einfache Lipidgrenzschicht vorliegen kann ( DANIELLI und HARVEY, 1935). Mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes konnten dann zwei verschiedene Schichten identifiziert werden : eine molekulare radial orientierte Schicht, der eine tangential orientierte Schicht aufgelagert ist ( SCHMIDT, 1936). Diese Befunde wurden so gedeutet, daß die radiale Schicht aus Lipiden, die tangentiale dagegen aus Proteinen besteht. Tatsächlich ergab die chemische Analyse, daß das Plasmalemma zu je 50 % aus Lipiden und Proteinen besteht ( vergl. BENSON, 1964).

Der mit Hilfe indirekter Methoden postulierte Bau des Plasmalemmas konnte im Elektronenmikroskop weitgehend bestätigt werden. Dabei erscheint die Plasmagrenzmembran sowohl nach $OsO_4$ - als auch nach Permanganat-Fixierung dreischichtig : zwei stärker kontrastierte Schichten bedecken beiderseits eine innere transparente.

Dieser Bau der Membran wurde bei einer Vielzahl von Organismen bestätigt ( vergl. ELBERS, 1964). Die Drei-Schichtigkeit des Plasmalemmas führte dazu, daß diese Membran ebenfalls zu den unit membranes gerechnet wurde (ROBERTSON, 1960). Die nach $OsO_4$-Fixierung zu beobachtende Struktur des Plasmalemmas wurde als Bestätigung für das von DANIELLI und DAWSON (1934) konzipierte Membranmodell angesehen.

Auch an künstlichen Membranen ließ sich das sandwichartige Modell demonstrieren. Außerdem stimmten Dicke, Wasserpermeabilität und elektrische Kapazität erstaunlicherweise recht gut mit den Werten, die von natürlichen Membranen bekannt sind, überein (HUANG et al., 1964).

Neben dieser schichtförmigen Struktur der Cytoplasmamembran wurde auch ein micellarer Bau diskutiert. Danach sollen die Lipide scheibchenförmige, sphärische oder zylindrische Micelle bilden, die in flüssig-kristallinem Zustand vorliegen. So wurde z.B. nachgewiesen, daß Phospholipidextrakte aus menschlichem Hirn unter bestimmten Bedingungen zylindrische Micelle zu bilden vermögen (LUZATTI und HUSSON, 1962). Im Röntgenbeugungsdiagramm war zu erkennen, daß die Lipide Hohlzylinder bilden. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die Hohlzylinder hexagonal geordnet ( STOECKENIUS, 1962). Auch mit Phosphorwolframsäure negativ gefärbte künstliche Membranen zeigten tubuläre Strukturen neben lamellaren (BANGHAM und HORNE, 1964). Die gleichen Autoren konnten am Plasmalemma nach Saponinbehandlung hexagonal angeordnete Strukturen nachweisen (vergl. auch DOURMASHKIN et al., 1962). Globuläre Membranstrukturen ließen sich auch nach Gefriertrocknung beobachten (SJÖSTRAND und ELFVIN, 1964).

Auf Grund dieser Befunde wurde von KAVANAU ( 1963) ein Membranmodell entworfen, das von der sandwichartigen Membranvorstellung abweicht. Danach sollen sich zwischen den beiden Proteinschichten hexagonal angeordnete zylindrische Lipidmicelle befinden. Die Kopfgruppen der Lipide sollen dabei in die Proteinschicht eindringen, während andererseits die Seitenketten apolarer Aminosäuren die Kopfgruppenregion der Lipide penetrieren und hydrophile Bindungen mit den lipophilen Ketten der Lipide eingehen. Das ergibt neben Wasserstoff-Brückenbindungen und polaren Wechselbeziehungen eine vielfach stabilisierte Membran.

Dieses Modell von KAVANAU ist auch geeignet, die Dynamik der Zellmembran zu veranschaulichen. Die Lipidmicelle sollen nämlich unter bestimmten Bedingungen zusammenfließen und dann eine kontinuierliche Schicht bilden. Auf diese Weise wäre auch ein aktiver Transport durch die Membran denkbar. Über die Einzelheiten eines solchen Transportes fehlen- ebenso wie für den Bläschentransport (Pinocytose)- experimentelle Daten.

Da die Lipidschicht für anorganische Ionen undurchlässig ist, wurde ein Träger postuliert, der das Ion durch die Membran schleust (vergl. MENGEL, 1966). Stets ließ sich eine Abhängigkeit des aktiven Ionentransportes vom Atmungsstoffwechsel nachweisen.

Neben dieser für die Zelle so eminent wichtigen selektiven Membranpermeabilität spielt das Plasmalemma sicher noch eine große Rolle als Sitz von Enzymen. So wurden markierte Aminosäuren sowohl in Membran- als auch in Enzymproteine eingebaut ( HENDLER, 1962).

Ein Verständnis der Funktion des Plasmalemmas erscheint nur über eine weitgehende Strukturaufklärung möglich. Bisher stützten sich die meisten Untersuchungen über die Struktur der Membranen auf elektronenmikroskopische Präparationsverfahren, bei denen mit Artefakten gerechnet werden muß ( vergl. Kapitel : Zum Artefaktproblem ). Daher kann vorläufig nicht entschieden werden, ob die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Strukturen real sind.

## Golgi-Apparat

Ein weiteres Membransystem der Zelle, das von einigen Autoren mit der Genese der Cytoplasmamembran in Verbindung gebracht wurde, ist der Golgi-Apparat.

Die von GOLGI (1898) in Ganglienzellen nach $OsO_4$- und $AgNO_3$ - Imprägnierung angefärbten bläschenartigen Strukturen ließen sich späterhin lichtmikroskopisch in den verschiedensten tierischen Zellen nachweisen. Wahrscheinlich wurden aber mit Hilfe der von Golgi angegebenen Methode die unterschiedlichsten Strukturen angefärbt ( vergl. HIRSCH, 1939). Zunächst nahm man an, daß die Golgi-Körper nur in tierischen Zellen vorkommen. Erst nach Einführung der elektronenmikroskopischen Präparationstechnik wurde der Golgi-Apparat auch in pflanzlichen Zellen beschrieben (PERNER, 1957 ; BUVAT, 1958a ; WHALEY et al., 1960). Somit scheint diese Struktur für alle eukaryotischen Zellen, mit einigen funktionell bedingten Ausnahmen, charakteristisch zu sein, während in Bakterien und Cyanophyceen keine Hinweise für die Existenz des Golgi-Apparates zu finden sind.

Nach DRAWERT und MIX (1961/62) soll die Grundeinheit des Golgi-Apparates die Golgi-Zisterne sein, die von einer in sich geschlossenen Membran begrenzt wird. An der Peripherie der Zisterne werden meist sogenannte Golgi-Vesikel abgeschnürt, die in einiger Entfernung als Golgi-Feld in Erscheinung treten können. Die Zisternen müssen als flachgedrückte Bläschen aufgefaßt werden, die übereinandergestapelt ein Dictyosom bilden. Die Gesamtheit der Dictyosomen einer Zelle, die nach MOLLENHAUER (1965) miteinander in Verbindung stehen sollen, stellen den Golgi-Apparat dar.

In ihrer Struktur stimmen die Golgi-Apparate von tierischen und pflanzlichen Zellen im elektronenmikroskopischen Bild weitgehend überein, so daß auch hier wieder eine überraschend morphologische Einförmigkeit festzustellen ist.

Die die Zisternen umgrenzende Membran wurde zunächst als unit membrane aufgefaßt (ROBERTSON, 1959). Nach neueren Befunden von SJÖSTRAND (1963) sowie YAMAMOTO (1963) sollen die Membranen des Golgi-Apparates jedoch von anderen Cytomembranen unterscheidbar sein ( vergl. auch MOLLENHAUER und MORRE, 1966 ). Zwischen benachbarten Zisternen wiesen TURNER und WHALEY (1965) fibrilläre Elemente nach, die mit den Zisternen nicht in Kontakt stehen sollen.

Die Struktur des Golgi-Apparates, vor allem die sich abschnürenden Vesikel, weisen auf eine besondere Funktion hin.

Von SCHNEPF (1960) stammten die ersten Hinweise auf eine mögliche Funktion des Golgi-Apparates in pflanzlichen Drüsenzellen in Verbindung mit der Sekretabsonderung. So ließen sich die Golgi-Vesikel in Insektivoren ähnlich wie der aus sauren Polysacchariden bestehende Fangschleim anfärben. Damit ist eine Beteiligung des Golgi-Apparates an der Sekretion bewiesen (SCHNEPF, 1965). Auch in anderen Fällen wurde eine Beteiligung der Dictyosomen an sekretorischen Prozessen nachgewiesen. So soll das ätherische Öl von Mentha in den Dictyosomen gebildet werden ( AMELUNXEN, 1964). Ob die Dictyosomen selbst Bildungsorte der Sekrete sind, oder ob sie die Stoffe nur akkumul ieren, ist noch nicht restlos geklärt. Die Proteine der Zymogengranula im Pankreas sollen von Polysomen synthetisiert werden und schließlich durch die Schläuche des endoplasmatischen Retikulums in die Zisternen der Dictyosomen gelangen ( PALADE et al, 1962).

Weiterhin wurde der Golgi-Apparat mit der Milch-Sekretion in Verbindung gebracht. Dabei soll das Milcheiweiss mit Hilfe der Golgi-Vesikel in den Zellapex gelangen ( HOLLMANN, 1959). Auch in einer großen Zahl anderer Drüsen scheint der Golgi-Apparat mit der Sekretion in Verbindung zu stehen. Von SIEVERS (1965 b ) wurde die Bedeutung des Golgi-Apparates darin gesehen, daß die Zelle mit Hilfe dieses Organells in der Lage ist, bereits in trazellulär bestimmte Stoffe, die autolytisch wirken können (Sekrete der Verdauungsdrüsen), durch eine Membranbarriere vom Cytoplasma abzugrenzen.

Im Sinne einer Sekretion muß auch die Zellwandbildung, an der die Golgi-Vesikel beteiligt sind, aufgefaßt werden. Nach MOLLENHAUER et al.(1961) sollen in den Dictyosomen die sauren Polysaccharide der Zellwandgrundsubstanz (Pektine) kondensiert werden. Außerdem wurde die Beteiligung der Golgi-Vesikel an der Zellplattenbildung nachgewiesen (WHALEY und MOLLENHAUER, 1963 ; FREY-WYSSLING et al. 1964). Auch das sich neu bildende Plasmalemma soll im Verlauf der Mitose aus zusammenfließenden Golgi-Membranen bestehen. Diese Beobachtungen konnten mit Hilfe der Autoradiographie in Verbindung mit der Elektronenmikroskopie bestätigt werden (PICKETT-HEAPS, 1967). Von diesem Autor wurde auch eine Beteiligung des Golgi-Apparates an der Vakuolisation pflanzlicher Zellen erwogen ( vergl. auch MARINOS, 1963).

Während Struktur und Funktion des Golgi-Apparates relativ gut bekannt sind, herrscht über die Art der Vermehrung dieses Organells noch Unklarheit. Eine de novo-Synthese wurde aus Lipid-Spheruliten (MERCER, 1962) , perinuclear bodies (WERZ, 1964) und innerhalb des Phragmoplasten (BUVAT, 1958 ) angenommen. Nach neueren Untersuchungen scheint eine Replication durch Fragmentation der Dictyosomen und anschließende Resynthese von neuen Zisternen am wahrscheinlichsten (MOLLENHAUER, 1965).

Ganz allgemein läßt sich feststellen, daß der Golgi-Apparat eine im Organismenreich weitverbreitete Zellstruktur darstellt, die aus mehreren Dictyosomen mit übereinandergestapelten Zisternen besteht und deren Funktion vor allem mit Sekretionsvorgängen in der Zelle in Verbindung gebracht werden kann.

Ein von dem Golgi-Apparat häufig abgeleitetes Membransystem stellen die Multivesicular Bodies dar.

## Die Multivesicular-Bodies

Die "multivesicular bodies" ( MVB ) wurden zuerst von BERNHARD et al., (1955) sowie PALAY und PALADE ( 1955) beschrieben. Synonym zu multivesicular bodies fanden auch die Begriffe " vesicular conglomerate " ( YAMADA et al., 1957) und " polyvesicular body " (ECHLIN et al., (1966) Verwendung. Morphologisches Erscheinungsbild dieses Organells ist ein Säckchen, oft aus einer Doppelmembran bestehend, das eine Anzahl von Bläschen umschließt. Auf Grund des Vorkommens von saurer Phosphatase wurden die MVB auch häufig zu den Lysosomen gerechnet ( MOE et al., 1965; MERKER 1965 ; SCHWARZ , 1966). WEISSENFELS ( 1967) unterschied drei verschiedene Typen von Lysosomen : 1.) Organellen mit feingranulärem Inhalt und meist wandständigen Vakuolen, 2.) Organellen mit vesikulärer Innenstruktur ( eigentliche MVB) und 3.) Organellen mit polymorphem Inhalt ( Mitochondrien, ER, Ribosomen). Der dritte Typ von Lysosomen wurde weiterhin unterteilt in Cytolysomen, wenn eigene Zellbestandteile und in Phagolysomen, wenn fremde Bestandteile abgebaut werden ( de DUVE, 1963).

Das Vorkommen der MVB scheint an bestimmte Zelltypen gebunden zu sein. De DUVE ( 1959) nahm an, daß sie für phagocytierende Zellen typisch sind. Spätere Untersuchungen ergaben aber, daß ihr Vorkommen offensichtlich nicht auf diesen Typ von Zellen beschränkt ist. Vor allem in verschiedenen Geweben der Säugetiere ist ihr Auftreten belegt ( LAWN, 1960, für die Magenwand der Ratte ; WARTENBERG et al., 1960, für das menschliche Ovarialei ; LANGE, 1961, für die Glandula parathyreoidea des Menschen; GUSEK, 1961, für die Belegzellen der Magenschleimhaut des Menschen; GRILLO et al., 1962 , für Ganglien- und Nervenzellen der adulten Ratte ; BEHNKE, 1963 für das Duodenum der foetalen Ratte ; FUCHS, 1963, für Endothel-und Skelettmuskelzellen).

Aus niederen systematischen Kategorien liegen weit weniger Informationen über das Auftreten von MVB vor. So beschrieb REBHUN (1960) MVB in marinen Invertebraten sowie ANTEUNIS et al., (1964) in reifen Oocyten von Artemia salina. PALAY ( 1960) konnte ihr Vorkommen in Neuronen des Goldfisches und WEISSENFELS ( 1967) in gezüchteten Hühnerherzmyoblasten nachweisen.

Nur wenig Befunde liegen über das Auftreten der MVB in pflanzlichen Zellen vor. Von MOLLENHAUER et al. (1961) wurden sie in Wurzelkappenzellen des Mais entdeckt. CAMEFORT ( 1965) erwähnte ihr Vorkommen in der Oosphäre bei Gingko biloba und SIEVERS ( 1965) konnte multivesikuläre Körper in den Rhizoiden von Chara foetida nachweisen. Im Tapetum der Pollenkörner von Ipomoea war das Auftreten von polyvesicular body auf frühe Stadien beschränkt ( ECHLIN, et al. 1966). Auch in meristematischen Sproßapices höherer Pflanzen sollen MVB vorkommen (GIFFORD und STEWART, 1967). Ebenso können sie für die Zellen der peripheren Region von pflanzlichen Gewebekulturen charakteristisch sein ( HALPERIN und JENSEN, 1967).

Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, daß die multivesikulären Einschlußkörper weit verbreitet sind, aber doch nur in bestimmten Zelltypen vorkommen. Es ist nun naheliegend anzunehmen, daß die Funktion der MVB mit dem Stoffwechsel der Zellen, in denen sie nachgewiesen wurden, eng gekoppelt ist.

Der Nachweis von MVB in reifen Oocyten, Samenzellen und in den Zellen der ersten Furchungsstadien ist möglicherweise ein Indiz, daß sie bei der Zellteilung und bei morphogenetischen Prozessen eine Rolle spielen ( SOTELO und PORTER ,1959 ; REBHUN, 1960 ; IZQUIERDO und VIAL, 1962 ; DALCQU, 1963 ; ANTEUNIS et al., 1964). Da in den Organellen neben Phosphatase ( NOVIKOFF und SHIN, 1964 ; ROBBINS et al., 1964 ; WEISSENFELS, 1967) auch ATP-spaltende Enzyme nachgewiesen wurden, könnte die Annahme von SCHWARZ ( 1966) zutreffen, daß die MVB im Rahmen der morphogenetischen Prozesse eine partielle Autolyse der Organellen verursachen. Vor allem die Autolyse der Ribosomen könnte die Voraussetzung für den Beginn eines neuen Differenzierungsschrittes (Beginn der Vorknorpelbildung bei Ratten) schaffen, damit Ribosomen, mit neuer Information ausgestattet, ihre Wirksamkeit entfalten können.

Ähnlich ließe sich das Auftreten von polyvesicular body in der Entwicklung der Pollenkörner von Ipomoea (ECHLIN et al., 1966) erklären. Auch hier war das Erscheinen der MVB an bestimmte Stadien der Entwicklung geknüpft. In dieses Bild von der möglichen Funktion der MVB passen auch die Befunde von CAMEFORT ( 1965) und JENSEN ( 1965), die die MVB in der Oosphäre von Pflanzen nachwiesen.

Neben dieser autolytischen Funktion im Rahmen der Morphogenese können die MVB auch mit Phagocytose in Verbindung gebracht werden. So konnten metachromatische und Fluorescenzfarbstoffe in den MVB beobachtet werden ( DALCQU, 1963 ; ROBBINS et al., 1964). Offenbar ist dieser Vorgang durch die vielen Membranen in den MVB, an die die Farbstoffe gebunden werden können, begünstigt. Die Bildung von MVB nach Crotonölbehandlung in den Epithelzellen der Rattenvagina läßt eine Phagocytose dieses zellfremden Stoffes mit Hilfe der MVB sehr wahrscheinlich werden (MERKER, 1965).

Eine weitere mögliche Funktion der MVB hängt eng mit ihrer Entstehung zusammen. Von der Mehrzahl der Autoren wird angenommen, daß die MVB aus den Golgiapparaten entstehen ( REBHUN, 1960 ; MOLLENHAUER et al., 1961 ; NOVIKOFF et al., 1964 ; HALPERIN und JENSEN, 1967). Hieraus könnte eine membran- oder wandbildende Funktion der MVB abgeleitet werden, da der Golgiapparat ebenfalls eine zentrale Rolle bei membranbildenden Prozessen spielt. (MOLLENHAUER et al., 1961 ; WOLFF, 1963).
Außerdem wurde das Auftreten der MVB in Verbindung mit pinocytotischen Prozessen in verschiedenen Geweben beschrieben (NOVIKOFF und SHIN, 1964 ; ROSENBLUTH und WISSIG, 1964).

Die bisher vorliegenden Befunde zeigen, daß die MVB in morphologischer und funktioneller Hinsicht offensichtlich ein sehr heterogenes Organellsystem darstellen.

Fragestellung

Die vorliegende Arbeit unternimmt den Versuch, zur Klärung der in der Einleitung berührten Probleme des Baues und- soweit möglich- der Funktion ausgewählter Membransysteme beizutragen. Vor allem jedoch soll die Frage im Vordergrund stehen, ob die makromolekulare Architektur der Membranen aus verschiedenen Organismen sich in einen gewissen Zusammenhang zu ihrer phylogenetischen Stellung bringen läßt.

Als moderne Untersuchungsmethode für diese Fragestellungen erschien besonders das Gefrierätzverfahren geeignet, da mit seiner Hilfe zum ersten Mal latent lebende Zellen elektronenmikroskopisch untersucht werden können. Damit ist die von anderen elektronenmikroskopischen Präparationstechniken her bekannte Artefaktgefahr weitgehend ausgeschaltet.

Voraussetzung für die Anwendung der neuen Methode ist allerdings ein strukturerhaltender Gefrierschutz der Zellen. Daher mußten in Voruntersuchungen Gefrierschutzmittel und Objekte auf ihre Eignung für das Gefrierätzverfahren systematisch getestet werden, zumal bisher als Objekte jeweils besonders ausgewählte Organismen benutzt wurden.

Besondere Schwierigkeiten waren offenbar bei höheren Pflanzen zu erwarten, da den weitgehend differenzierten Geweben ein Frostschutz bisher nicht vermittelt werden konnte (vergl. BRANTON und MOOR, 1964). Diese Schwierigkeiten sollten umgangen werden durch die Verwendung stetig wachsender pflanzlicher Gewebekulturen, die als Objekt besonders geeignet erschienen. Daneben sollte zu Vergleichszwecken auch eine Reihe anderer Organismen untersucht werden.

Waren die Voraussetzungen ( geeignetes Objekt und strukturerhaltender Gefrierschutz ) erfüllt, sollten bestimmte Membranstrukturen von latent lebenden Organismen der verschiedensten systematischen Stellung vergleichend untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten schließlich vor allem die Frage klären, ob das bekannte Konzept von der Einheitlichkeit des Bauprinzips aller biologischen Membranen ( " unit membrane-Konzept" ; ROBERTSON 1959 ) heute noch aufrecht erhalten werden kann.

## Material und Methoden

### Pflanzliche Gewebekultur

Eines der Objekte für die vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen stellt die pflanzliche Gewebekultur dar. Als Ausgangsmaterial sollten Kalluskulturen verwendet werden, die drei Kriterien erfüllten:

1. unbegrenzte Kultivierbarkeit
2. Fähigkeit zur Morphogenese und
3. Fähigkeit zum Ergrünen

Hinsichtlich dieser drei Kriterien wurden die Kalli folgender Samenpflanzen getestet:

Crocus flavus[1]
Crocus kotschyanus[1]
Portulaca oleracea[1]
Hypochaeris radicata[1]
Crepis zacintha[1]
Helianthus annuus[1]
Zichorie ( Sorte Fredonia )[2]
Karotte :( Sorte: Lange Rote ...)[2]
Topinambur[2]
Schwarzwurzel[2]

Das Ursprungsgewebe der Kalli waren entweder Sproß-und Wurzelspitzen[1] oder Explantate der Speicherorgane[2] .

### Dinoflagellaten

Für die vergleichenden Gefrierschutz-und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden folgende Arten berücksichtigt:

Gymnodinium spec.[3]
Amphidinium carteri[4]
Prorocentrum[3]
Oxyrrhis marina[5]

[1] Für die Überlassung der Samen habe ich Herrn Dr. Schulze-Menz aus dem Berliner Botanischen Garten zu danken.

[2] Die Speicherorgane verdanke ich dem Bundessortenamt in Rethmar.

[3],[4],[5] Für die Überlassung von Amphidinium carteri habe ich Herrn Professor Dr. K. Mühlethaler, Institut für allgemeine Botanik der ETH Zürich, für Gymnodinium spec. sowie Prorocentrum micans Herrn Dr. E. A. George, Culture Collections of Algae and Protozoa, Cambridge und für Oxyrrhis marina Herrn Professor Dr. H. v. Stosch, Botanisches Institut der Universität Marburg, zu danken.

Euflagellaten

Als Vertreter der Euflagellaten wurde Euglena gracilis ( Stamm Z )[6] untersucht.

Grünalgen

Folgende zwei Arten wurden zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierätzung herangezogen:

Chlorella saccharophila[6]
Chlorella pyrenoidosa[6]

Pilze

Das zur Untersuchung gelangende Mycel des Schimmelpilzes Penicillium spec. stammte aus einer mit Sporen des Pilzes infizierten Gefrierschutzlösung.
Außerdem wurde auch die zu den Hefen gehörende Art Schizosaccharomyces pombe[7] elektronenoptisch untersucht.

Moose

Aus der Klasse der Lebermoose wurde Marchantia polymorpha[1] untersucht.

Farne

Aus der Klasse der Farne wurde das wintergrüne Asplenium adiantum nigrum [1] für die vergleichenden Untersuchungen ausgewählt.

Samenpflanzen

Als Kontrolle für die Gewebekulturen wurden Keimpflanzen von Karotten ( Sorte : Lange Rote ...) sowie Samenanlagen von Rhinanthus alectorolophus[8] verwendet .

FL-Zellen

Zum Vergleich mit den pflanzlichen Organismen wurden als Gewebekulturen menschlichen Ursprungs FL- Zellen[9] untersucht.

[6] Für die Überlassung der Euglenen und Chlorella-Arten bin ich Herrn Dr. W. Koch, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, zu Dank verpflichtet.

[7] Die Hefeart Schizosaccharomyces überließ mir freundlicherweise Herr Dr. C. C. Emeis, Institut für Gärungsgewerbe der Technischen Universität Berlin.

[8] Die Samenanlagen von Rhinanthus wurden im Park des Humboldt-Schlößchens, Berlin-Tegel, gesammelt.

[9] Die Gewebekultur der FL-Zellen verdanke ich Herrn Dr. Averdunk, Institut für Angewandte Physiologische Chemie und Klinische Chemie

## Kultur der untersuchten Organismen

### Pflanzliche Gewebekulturen

Die Kultivierung der Kalli erfolgte auf festen Nährböden mit 0,7 % Agar. Die anorganischen Nährsalze wurden nach den Rezepturen von WHITE ( 1964) und HELLER ( 1953) zusammengestellt. Als Wuchsstoffe fanden ß-Indolylessigsäure, α-Naphthylessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure Verwendung. Außerdem gehörte konstant zu jedem Nährboden ein Zusatz von Vitaminen ( REINERT und WHITE, 1956) und Saccharose ( GAUTHERET, 1961). In der Regel wurde als Wachstumsstimulans entweder Kokosnußmilch oder Hefeextrakt dem Nährboden hinzugesetzt ( vergl. STEWARD und CAPLIN, 1951 ; JAGENDORF und BONNER, 1953). Die Kultur der Kalli erfolgte bei 24° C + 1° entweder im Dunkeln oder im Dauerlicht ( Lichtquelle: Osram 40 Watt / 32 R). Der Übertragungsrhythmus bei der Subkultivierung der Kalli betrug 4-6 Wochen.

Von den verschiedenen Pflanzenarten erwiesen sich die Kalluskulturen des monokotylen Crocus kotschyanus und der dikotylen Karotte hinsichtlich der obenerwähnten drei Kriterien als geeignet.

Optimales Wachstum zeigten Karottenkalli auf Nährböden mit $10^{-8}$ g/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure + 0,2 % Hefeextrakt, während die Kalli von Crocus auf Nährböden mit $10^{-6}$ g/ml α-Naphthylessigsäure + 5 % Kokosnußmilch am besten wuchsen. Seit über drei Jahren konnten die Kulturen auf diesen Nährböden ununterbrochen gehalten werden, so daß das Kriterium der unbegrenzten Kultivierbarkeit als erfüllt angesehen werden kann.

Hinsichtlich des zweiten Kriteriums, der Morphogenese, reagierten die Kalluskulturen der beiden Pflanzenarten unterschiedlich. Die Karottenkalli bildeten in den ersten 6 Monaten nach Anlegen der Kultur spontan reichlich Wurzeln. Nach diesem Zeitraum wuchs der Kallus meist ohne makroskopisch sichtbare Differenzierungen.

Eine Sproß- und Wurzelregeneration ließ sich jedoch durch Entzug des Wuchsstoffes induzieren.

Dagegen bildeten die Kalluskulturen von Crocus während der gesamten Kulturdauer spontan Wurzeln aus. Eine Sproßregeneration durch Entzug des Wuchsstoffs ließ sich nicht induzieren, da die Gewebe bei Wuchsstoffmangel abstarben.

Die Fähigkeit zum Ergrünen, das dritte Kriterium, war offenbar mit dem Wachstum der Gewebe korreliert, denn erst nach Abschluß der Wachstumsperiode wurde von den Karottenkulturen peripher reichlich Chlorophyll gebildet ( vergl. HOFFMANN und KARSTEN, 1966). Möglicherweise ist die Hemmung der Chlorophyllsynthese während der Wachstumsphase auf die Saccharose im Nährmedium zurückzuführen, denn Zucker soll bei einigen Pflanzen eine bleichende Wirkung ausüben ( vergl. SHIHIRA- ISHIKAWA und HASE, 1964).

Eine Kontrolle dieser Beziehung ließ sich nicht durchführen, da der Zucker für die Gewebekulturen offenbar essentiell ist und sein Entzug im Nährmedium stets zum Absterben der Gewebe führte ( vergl. VASIL und HILDEBRANDT, 1966).

Um die unterschiedlichen Stadien der Chlorophyllbildung zu erfassen, wurden Teile der Kalli nach verschiedener Kulturdauer für die Elektronenmikroskopie präpariert.

Dinoflagellaten

Die Kultur der Dinoflagellaten erfolgte in natürlichem Meerwasser ( bezogen von der Biologischen Anstalt, Helgoland) unter Zusatz von 2,5 % Erdextrakt, 0,01 % $KNO_3$ und 0,001 % $K_2HPO_4$ bei Dauerlicht ( Lichtquelle: wie bei den pflanzlichen Gewebekulturen).

Euglena

Die Euglenen wurden in einem von PRINGSHEIM (1954) angegebenen Nährmedium mit Natriumacetat, Trypton, Hefeextrakt und Fleischextrakt im Dauerlicht ( Lichtquelle: wie oben angegeben ) kultiviert.

Chlorella

Die Kultivierung von Chlorella pyrenoidosa erfolgte in einem von SHIHIRA-ISHIKAWA und HASE ( 1964) angegebenen Medium im Dauerlicht (Lichtquelle: wie bei Gewebekulturen). Bei der Kultivierung von Chlorella saccharophila wurde diesem Medium noch 1,3% Saccharose hinzugefügt.

FL-Zellen

Diese tierischen Gewebekulturzellen wurden in Hankslösung mit Lactalbumin und Hefezusatz bei 37°C kultiviert ( vergl. HENNEBERG und KÖHLER, 1961).

Gefrierschutzuntersuchungen

Die kryoskopischen Messungen des osmotischen Druckes der Gefrierschutzmittel wurden mit Hilfe eines Osmometers der Firma Knauer durchgeführt.

## Elektronenmikroskopische Präparationstechnik

### Dünnschnitt-Technik

a. Fixierung

Als Fixierungsmittel fanden folgende Lösungen Verwendung:

2% $OsO_4$ in Phosphatpuffer, pH 7,0

1% $OSO_4$ in Veronal-$Ca^{++}$ + 2% Glucose, pH 7,0

1,5% $OsO_4$ + 1,65% $K_2Cr_2O_7$ in Veronal-$Ca^{++}$, pH 7,1

( vergl. WOHLFARTH-BOTTERMANN, 1957)

1,5% $OsO_4$ + 1,65% $K_2Cr_2O_7$ in 20% Meerwasser, pH 7,1

2% $KMnO_4$ in Veronalpuffer, pH 7,0 (vergl. LUFT, 1956)

2% $KMnO_4$ in Veronalpuffer + 2% Glucose, pH 7,0

2% $KMnO_4$ in destilliertem Wasser, pH 7,1

6,25 % Glutardialdehyd in Phosphatpuffer, pH 7,0

6,25 % Glutardialdehyd in 20 % Meerwasser, pH 7,1

6,25 % Glutardialdehyd + 2 % $OsO_4$ + 1% Phosphorwolframsäure, pH 7,1 (DANEEL und WEISSENFELS, 1965)

2,5% Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer + 5 % Glucose, pH 7,0

2% Glutardialdehyd in Veronalpuffer + 2% Glucose, pH 7,1

Ernst' sches Gemisch ( RESCH und PEVELING, 1964)

Fixierungsdauer: 1 - 24 Std.

Fixierungstemperatur : $0^0$ - Raumtemperatur

b. Waschung

Die fixierten Gewebe wurden in den jeweiligen Lösungsmitteln (Veronal- Phosphat - Cacodylat - Puffer, 20 % Meerwasser, dest. Wasser) gewaschen.

c. Nachfixierung

Wenn mit Glutardialdehyd fixiert wurde, folgte meist eine Nachfixierung mit einer der $OsO_4$-Lösungen. Zudem wurde regelmäßig eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat durchgeführt (vergl. STRUGGER, 1956).

d. Entwässerung

Die Entwässerung erfolgte stets über eine Alkoholreihe, wobei der Alkohol zur Vermeidung von Extraktionen mit Saccharose gesättigt war. Bei Einbettung in Vestopal, Araldit und Durcupan ACM wurde als Vermittler zwischen dem Alkohol und dem Einbettungsmittel Aceton, bei Einbettung in Epon und Maraglas Propylenoxyd verwendet.

e. Einbettung

Als Methacrylate fanden das von KUSHIDA (1961) beschriebene Benzin-Methacrylat ( Ester 2:8 + 3% Divinylbenzin + 1% Peroxyd) sowie Plexigum (BAYER und PETERS, 1959) Verwendung. Darüberhinaus wurde eine Reihe von Epoxyden, wie Epon nach den Rezepturen von LUFT ( 1961 ) und KUSHIDA ( 1966), Araldit (GLAUERT und GLAUERT, 1958) und Maraglas (ERLANDSON, 1964) hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Einbettung der pflanzlichen Gewebekulturen getestet.
Als Polyester wurde Vestopal W verwendet ( vergl, RYTER und KELLENBERGER, 1958).

f. Dünnschnitte

Für die Anfertigung der Dünnschnitte standen Porter-Blum-Mikrotome sowie ein LKB-Mikrotom zur Verfügung. Das Auffangen der Schnitte erfolgte auf Formvar-befilmten Cu-Netzen.

g. Schnittkontrastierung

Die Schnitte wurden entweder mit Dämpfen von Chromylchlorid (vergl. BULLIVANT und HUTCHIN, 1960) oder mit Bleicitrat ( vergl. REYNOLDS, 1963) kontrastiert.

h. Elektronenmikroskope

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen standen zwei Siemens-Elektronenmikroskope vom Typ ÜM 100 d und Elmiskop I zur Verfügung. Die Aufnahmen erfolgten auf Guilleminot- oder Agfa -Gevaert-Platten.

Gefrierätztechnik

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens wurden nach der von MOOR ( 1964) entwickelten Methode durchgeführt. Dabei wurden die Objekte nicht- wie von Moor angegeben- auf Cu-Netzen , sondern wegen der besseren Wärmeableitung auf Stufenblenden, die aus Reinsilber bestanden, eingefroren.
Die Zell-und Gewebereste entfernten wir nach der Bedampfung (mit C/Pt) von der Replica mit Hilfe von Eau de Javelle und Chromsäure. Danach wurden die Replica auf unbefilmten Cu-Netzen aufgefangen und elektronenmikroskopisch untersucht.

## Untersuchungsergebnisse

### Systematische Untersuchungen des Gefrierschutzes verschiedener Organismen als Voraussetzung für die Anwendung des Gefrierätzverfahrens.

Nachdem in Form der Gewebekulturen der momokotylen Crocus kotschynanus und der dikotylen Daucus carota 2 geeignete Untersuchungsobjekte, die zu den höheren Pflanzen gehörten, zur Verfügung standen, sollte unter Berücksichtigung des phylogenetischen Gesichtspunktes auch eine Reihe von Organismen anderer systematischer Kategorien mit Hilfe der Gefrierätztechnik vergleichend untersucht werden. Die wichtigste Voraussetzung für die Untersuchung all dieser Organismen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens war ein ausreichender Gefrierschutz, der durch Vermittlung von Gefrierschutzmitteln erreicht werden kann. Als Kriterium für die Verwendbarkeit eines Gefrierschutzmittels galten:

1. ein ausreichender Schutz der Zelle, der verhindert, daß das Zellwasser Eiskristalle bildet und die Organellen zerstört werden,

und 2. keine oder eine möglichst geringe Toxizität.

Die Permeation und die sich daraus ergebende Schutzwirkung wurden mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die von den Abdrucken der Zellen erhalten wurden, kontrolliert. Bei mangelndem Gefrierschutz war ein mehr oder weniger großer Prozentsatz der Zellen durch Eiskristalle zerstört. Die Toxizität der Gefrierschutzmittel ließ sich durch eine Beobachtung des Wachstums der Gewebe bzw. der Bewegung der Flagellaten feststellen. Da toxische Wirkungen z.B. auf eine zu große Erhöhung des osmotischen Drucks des Außenmediums zurückgeführt werden können, wurden die osmotischen Werte verschiedener Konzentrationen der Gefrierschutzmittel kryoskopisch ermittelt. Für die marinen Flagellaten wurde hierbei als Bezugssystem Meerwasser gewählt und die ermittelten osmotischen Werte in Tabelle I graphisch dargestellt.
Für alle anderen Organismen galt eine Nährlösung nach White $\pm$ KOM als Bezugssystem ( Tabelle II). Nach diesen Tabellen wurden Konzentrationen der Gefrierschutzmittel, die eine zu starke Erhöhung des osmotischen Wertes des Außenmediums verursachten, ausgeschieden. Da die untersuchten Organismen zu systematisch sehr unterschiedlichen Kategorien gehörten, war zu erwarten, daß sie auch auf die verwendeten Gefrierschutzmittel verschieden reagierten.

Tabelle I: Kryoskopisch ermittelte osmotische Werte von Gefrierschutzmitteln für Meeresorganismen

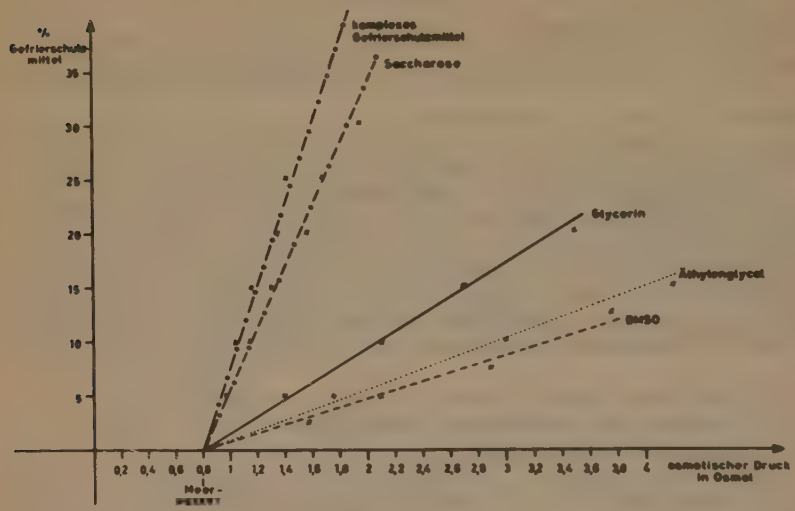
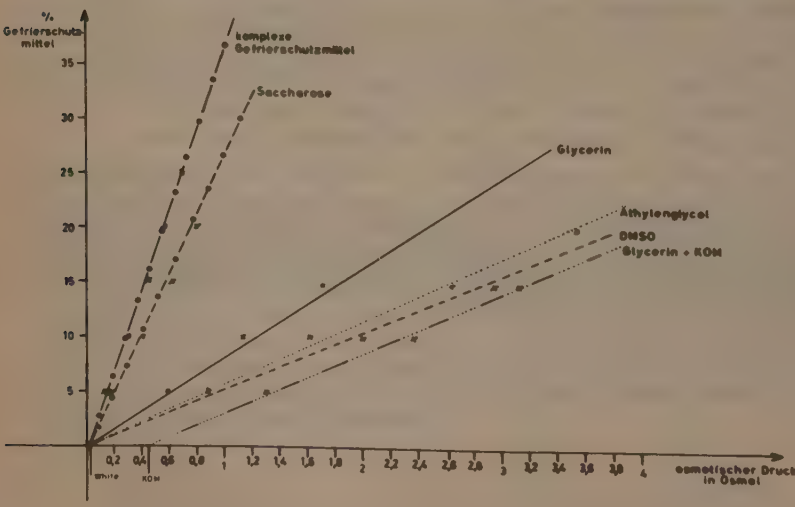



Tabelle II: Kryoskopisch ermittelte osmotische Werte von Gefrierschutzmitteln für Süßwasserbewohner und Landpflanzen



Neben der systematischen Stellung der Arten war auch wichtig, in welcher Form unsere Untersuchungsobjekte vorlagen und zwar, ob als Einzelzellen oder Gewebe.

Hinsichtlich des Gefrierschutzes wurden als Vertreter der ersten Gruppe Dinoflagellaten und als Vertreter der zweiten Gruppe die Kalluskulturen von Krokus und Karotten eingehender untersucht.

## Dinoflagellaten

Von den Dinoflagellaten wurden 3 Arten untersucht: Amphidinium carteri, Gymnodinium spec. und Oxyrrhis marina. Hinsichtlich ihres Verhaltens auf die Gefrierschutzmittel ließen sich 2 Gruppen unterscheiden:

1.) Amphidinium und Gymnodinium sowie
2.) Oxyrrhis marina.

Zunächst soll die Reaktion der Dinoflagellaten auf die verschiedenen Gefrierschutzmittel im Einzelnen untersucht werden. Die beiden Arten, die zur ersten Gruppe gehören, reagierten empfindlich auf eine zu starke Erhöhung des osmotischen Wertes des Außenmediums durch Gefrierschutzmittel. Die Beweglichkeitskontrolle, die nach 2 und 24 Stunden durchgeführt wurde, ergab, daß von den beiden Arten nicht mehr als 1,6 - 1,8 Osmol toleriert wurden. Da die schützenden Konzentrationen der Gefrierschutzmittel Glycerin, Dimethylsulphoxyd (DMSO) und Äthylenglycol jenseits dieser Toleranzgrenze liegen, mußten andere Gefrierschutzmittel gefunden werden. Die getesteten Saccharosekonzentrationen übten keine Schutzwirkung aus. Erst ein kombiniertes Gefrierschutzmittel, das aus 0,25 % Polyvinylpyrrolidon ( PVP ) , 5% Kälberserum und 5% Glycerin bestand und unterhalb der Toleranzgrenze lag, ergab positive Beweglichkeitskontrollen und Gefrierschutz. In diesem komplexen Gefrierschutzmittel (Tab. I) war außerdem 20% Eagle-Basalmedium enthalten. Die Verwendung von PVP als polymerem Schutzmittel und Kälberserum wurde vorher erfolgreich bei tierischen Gewebekulturzellen getestet ( VOS und KAALEN, 1965).

Ein im Prinzip anderes Verhalten auf Gefrierschutzmittel zeigte Oxyrrhis. Von diesem Organismus wurden wesentlich höhere osmotische Werte vertragen. So waren die Flagellaten nach 2 Stunden noch in 20% Glycerin, gelöst in Meerwasser, beweglich und zeigten bei elektronenmikroskopischer Kontrolle der gefriergeätzten Präparate einen guten Erhaltungszustand. Dagegen verliefen die Beweglichkeitskontrollen bei Anwesenheit von 15% Äthylenglycol im Medium negativ. Mit Saccharose und DMSO wurde kein Schutz der Zellen erreicht, während das komplexe Gefrierschutzmittel in Konzentration wie sie bei Gruppe 1 angewendet wurde, eine Schutzwirkung auf Oxyrrhis ausübte.

Die Ergebnisse der Gefrierschutzuntersuchungen an den 3 Dinoflagellaten wurden in Tabelle III zusammengefaßt. Mit + wurden nur Gefrierschutzmittel bedacht, die keine oder eine geringe Toxizität besaßen und die Zellen mit einem ausreichenden Gefrierschutz versahen.

Tabelle III: Gefrierschutz bei Dinoflagellaten

| Gefrierschutzmittel | | Gymnodinium | Amphidinium | Oxyrrhis |
|---|---|---|---|---|
| Glycerin in % | 10 | - | - | - |
| | 15 | - | - | - |
| | 20 | - | - | + |
| DMSO in % | 5 | - | - | - |
| | 10 | - | - | - |
| Saccharose in % | 30 | - | - | - |
| Äthylenglycol in % | 10 | - | - | - |
| | 15 | - | - | - |
| komplexes Medium (5% Glycerin, 5% Kälberserum, 0,25% PVP, 20% Eagle-Basalmedium) | | + | + | + |

Euglena gracilis

Die in der Tabelle III zusammengestellten Gefrierschutzmittel wurden statt in Meerwasser in Nährlösung nach White gelöst. Ihre Wirkung auf die Euglenen wurde dann ähnlich wie bei den Dinoflagellaten getestet. Dabei ergab sich ein den Dinoflagellaten der ersten Gruppe weitgehend identisches Verhalten, denn wie bei Gymnodinium und Amphidinium gelang allein mit dem komplexen Gefrierschutzmittel ein ausreichender Gefrierschutz der Zellen.

## Chlorella

Die beiden Arten Chlorella pyrenoidosa und Chlorella saccharophila wurden wie die Flagellaten in dem komplexen Gefrierschutzmittel, das sich für Einzelzellen eignete, eingefroren.

## Penicillium

Die Sporen von Penicillium keimten in einer Lösung von 20% Glycerin + 25% Kokosnußmilch ( KOM ) und wurden auch in dieser Lösung eingefroren. Der Gefrierschutz war gut.

## Marchantia und Asplenium

Von dem Lebermoos Marchantia polymorpha wurden Teile des Thallus und von dem Farn Asplenium adiantum nigrum Teile der Blätter in die Gefrierschutzmittel eingelegt. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Pflanzen lagen hier kompakte Gewebeverbände vor. Wenn die excisierten Teile 16 Stunden in einer Lösung von 20 % Glycerin, 25 % KOM und Nährlösung nach White belassen und danach eingefroren wurden, ließ sich in den gefriergeätzten Präparaten elektronenmikroskopisch ein ausreichender Schutz nachweisen. Wachstumskontrollen hinsichtlich der Toxizität des Glycerins ließen sich naturgemäß nicht anstellen. Entscheidend für den Schutz dieser Gewebe war ihr Standort vor Excision. Beide wurden von Pflanzen, die im Kaltgewächshaus standen, im Januar geerntet. Offenbar hatten sich die Gewebe an die kühlen Temperaturen angepaßt und konnten somit das Einfrieren besser überstehen. An Kontrollen aus dem Warmgewächshaus ließ sich diese Vermutung bestätigen, denn Teile von Farnblättern konnten mit dem obenerwähnten Gefrierschutzmittel nie ausreichend geschützt werden.

Das Ausmaß der toxischen Wirkungen des Gefrierschutzmittels läßt sich an ausdiffenzierten Geweben, z.B. Blattgewebe von Marchantia und Asplenium, nicht kontrollieren, da ja kein Wachstum der ausdifferenzierten Gewebe mehr erfolgt. Daher sollte ein Objekt gefunden werden, an dem die Wirkung des Gefrierschutzmittels durch Kontrolle des Wachstums gemessen werden konnte. Dieses günstige Objekt stand in Gestalt der rasch wachsenden pflanzlichen Kalluskultur zur Verfügung.

Gewebekultur höherer Pflanzen

Um das Gefrierschutzmittel in die Gewebe einzuführen, wurden 3 verschiedene Versuche angesetzt. Zunächst wurden Explantate aus der kambialen Region der Speicherwurzel von Cichorium, Topinambur und Daucus in flüssige Kulturlösungen mit 20 % Glycerin eingebracht. Die Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit war die gleiche wie die der festen Nährböden ( bis auf den Agar ). Die Nährlösungen wurden zusammen mit den Explantaten auf einem Schüttler bewegt. Eine Modifikation des Verfahrens bestand darin, daß anstatt der Kölbchen Gaswaschflaschen benutzt wurden, um die Kulturen nach Vorschaltung von Filtern belüften zu können. Bei Anwendung dieser beiden Verfahren war bei keinem der untersuchten Gewebe eine sichtbare Proliferation erfolgt, und die Gewebe verfärbten sich nach 3 Wochen braun und starben ab.

In einem weiteren Versuch, Glycerin in die Gewebe einzuführen, sollten Kalluskulturen der Karotten durch steigende Glycerinkonzentrationen schrittweise an Glycerin gewöhnt werden. Jedoch schon bei Anwesenheit von 5 % Glycerin im Nährboden war das Wachstum sehr stark gehemmt und die Kulturen starben langsam ab. Damit war auch dieser Weg, über eine schrittweise Anpassung Glycerin in die Gewebe einzuführen, nicht gangbar.

In einer dritten Versuchsanordnung wurden die betreffenden Gefrierschutzmittel auf die Agaroberfläche in den Kulturröhrchen pipettiert, so daß ein Teil des auf dem Nährboden wachsenden Gewebes mit den Lösungen bedeckt war. Zur Kontrolle wurden die getesteten Lösungen auch auf festen Nährboden ohne Gewebe gebracht. In diesem Falle blieben die Lösungen unverändert auf dem Nährboden stehen, während sie in Gegenwart von Geweben verschwanden, d.h. von den Geweben aufgenommen wurden. Die restlose Aufnahme von 0,5 ml Glycerin dauerte bei den Daucus-Kulturen 4 bis 5 Tage, während die Crocus-Gewebe für die gleiche Menge Glycerin 6 bis 7 Tage benötigten.

Ein Vergleich mit unbehandelten Kontrollen ergab, daß durch das Glycerin keine sichtbare Beeinträchtigung des Wachstums erfolgte. Einige Gewebe von Daucus wurden 10 mal im Abstand von 8 Tagen mit je 0,5 ml Glycerin versorgt, ohne daß eine merkliche Beeinträchtigung des Wachstums stattfand.

Dagegen wiesen die mit 10 und 15 % Äthylenglycol versetzten Gewebe nach 10 Tagen eine beginnende Braunfärbung auf, die auf toxische Wirkungen des Äthylenglycol zurückgeführt werden müssen. Somit war dieses Gefrierschutzmittel für unsere Untersuchungen ungeeignet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde den Geweben 10% DMSO angeboten. Die Kalli absorbierten die Menge von 0,5 ml DMSO innerhalb von 2 bis 3 Tagen. Das Wachstum der Gewebe war im Vergleich zu den Kontrollen deutlich abgeschwächt. Dagegen konnte bei Zusatz von 30% Saccharose bzw. Glucose keine Wachstumshemmung beobachtet werden. Bei Zugabe von 0,5 ml Kokosnußmilch ( KOM) war gegenüber den Kontrollen eine geringe Wachstumssteigerung festzustellen, desgleichen bei Kombination von 25% KOM mit 20% Glycerin.

Nach dem Ergebnis dieses Wachstumstestes wurde Äthylenglycol als Gefrierschutzmittel für die pflanzlichen Gewebe ausgeschieden, während die anderen Substanzen hinsichtlich ihres Gefrierschutzes kontrolliert werden sollten.

Wenn die Einwirkung der Gefrierschutzmittel bis zum Einfrieren bei Raumtemperatur erfolgte, zeigten sämtliche gefriergeätzten Präparate Gefrierschäden. Wurde dagegen die Temperatur vor dem Einfrieren auf 4° C erniedrigt, ließ sich bei Präparaten, die vorher mit 20% Glycerin bzw. 20% Glycerin + 25% KOM versehen waren, eine Vitrifizierung feststellen ( Abb. 1). Der Erhaltungszustand der Zellen war bei Anwendung von Glycerin allein nicht so gut, wie bei Kombination des Glycerins mit der KOM. Alle anderen getesteten Lösungen konnten auch nach Vorbehandlung bei 4° C den Kalluskulturen keinen strukturerhaltenden Gefrierschutz verleihen (Tabelle IV).

Tabelle IV: Gefrierschutz bei pflanzlichen Gewebekulturen

| Gefrierschutzmittel | | Daucus | Crocus |
|---|---|---|---|
| Glycerin in % | 10 | - | - |
| | 15 | - | - |
| | 20 | +- | +- |
| DMSO in % | 10 | - | - |
| Saccharose in Mol | 0,7 | - | - |
| Glucose in Mol | 0,7 | - | - |
| Äthylenglycol in % | 15 | - | - |
| Kokosnußmilch | (KOM) | - | - |
| 25% KOM + 20% Glycerin | | + | + |
| komplexes Medium (5% Glycerin, 5% Kälberserum, 0,25% PVP, 20% Eagle | | - | - |

## Ausdifferenzierte Gewebe höherer Pflanzen

Um zu kontrollieren, ob die Gewebekultur das vermutete günstige Objekt für Gefrierschutzuntersuchungen bei höheren Pflanzen ist, wurden zum Vergleich Blatteile von Karottenpflänzchen in 20 % Glycerin + 25 % KOM eingelegt und in dieser Lösung bei 4° C belassen. Diese Vorbehandlung, die den Kalluskulturen von Daucus zu einem vollständigen Gefrierschutz verhalf, reichte bei den Blattstückchen nicht zu einem vollständigen Gefrierschutz aus. Bestenfalls waren Chloroplasten erhalten, während andere Organellen durch Eiskristallbildung zerstört wurden.

## Gefrierschutz von FL-Zellen

Im Gegensatz zu den pflanzlichen Gewebekulturen, die als kompakter Verband vorliegen, bestehen Kulturen aus tierischen Zellen vorwiegend aus Einzelzellen ( FL-Zellen ). Dieser Unterschied war wahrscheinlich maßgebend für ein verschiedenes Verhalten gegenüber den getesteten Gefrierschutzmitteln. Im Wachstumstest zeigte sich, daß 20 % Glycerin im Medium von den FL-Zellen nicht mehr vertragen wurde. Bei Anwendung von 10 % Glycerin trat keine Wachstumshemmung auf, aber in den gefriergeätzten Präparaten konnten Gefrierschäden beobachtet werden. Wenn jedoch 10 % Glycerin mit dem komplexen Gefrierschutzmittel kombiniert wurden, ließ sich ein völliger Gefrierschutz erreichen ; allerdings nur dann, wenn die Zellen sich mindestens 3 Stunden vor dem Einfrieren bei einer Temperatur von 4° C in dem Gefrierschutzmittel befanden.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß für Einzelzellen ein komplexes Gefrierschutzmittel mit polymerem Anteil als optimal angesehen werden darf, während für kompakte Gewebe nach Art der Gewebekulturen Glycerin in Verbindung mit Kokosnußmilch den besten Gefrierschutz bietet.

Diese Untersuchungen über den Gefrierschutz, deren Ziel ein optimaler Frostschutz für Organismen verschiedener systematischer Stellung war, schufen die Voraussetzung für die Anwendung des Gefrierätzverfahrens. Mit Hilfe dieser Technik sollte nun im morphologischen Teil der Arbeit die Ultrastruktur der Membranen ausgewählter Organellen aus verschiedenen Organismen vergleichend untersucht werden.

## Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Membransystemen

### I. Plasten

#### 1. Photosynthetischer Apparat

Um den Feinbau dieses Organells bei Organismen verschiedener systematischer Stellung zu analysieren, wurden folgende Gruppen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens untersucht: Dinoflagellaten, Euflagellaten, Grünalgen, Moose, Farne und Aniospermen.

##### Dinoflagellaten

Untersucht wurden die drei Dinoflagellatenarten Gymnodinium spec., Amphidinium carteri und Prorocentrum micans. Da sich innerhalb der drei Arten keine Unterschiede im Bau des Chromatophors erkennen lassen, gelten die folgenden Befunde für alle drei Arten.

Charakteristisch für das Chromatophor der Dinoflagellaten ist seine Gestalt : ringförmig werden der Kern und der größte Teil des Cytoplasmas umschlossen (Abb. 2). An mindestens einer Stelle ist das Chromatophor durch einen stielartigen Fortsatz vermutlich mit der Zellperipherie verbunden (Abb. 3).

Somit ergibt sich fast das Bild eines in der Zelle "aufgehängten" photosynthetischen Apparates. Innerhalb des kranzförmigen Gebildes verlaufen meist dicht gepackte Membranen parallel nebeneinander (Abb. 4). An einigen Stellen, wahrscheinlich im Bereich des stielartigen Fortsatzes, wird erkennbar, daß die dichtgepackten Membranen paarig angeordnet sind. Oft lassen die quergebrochenen Membranen einen partikulären Aufbau erkennen. Deutlich wird das in Brüchen, in denen ein großer Teil der Oberfläche der Lamellen freigelegt ist. In Abb. 5 z.B. sind auf einem Teil der Oberfläche Partikel mit einem Durchmesser von 110 Å zu erkennen. Auf dem größeren Teil der Oberfläche lassen sich jedoch keine Partikel nachweisen. Andere angebrochene Oberflächen scheinen völlig ohne Partikelbesatz zu sein, so daß zu vermuten ist, daß nur eine Seite der Membran mit Partikeln besetzt ist. Diese Partikel lassen auf der Oberfläche keine periodische Anordnung erkennen. Da Oberflächenbrüche der Thylakoidmembranen bei Dinoflagellaten leider nur sehr selten auftreten, läßt sich ein genaueres Bild über den makromolekularen Bau der photosynthetisch aktiven Membranen bei Dinoflagellaten nur schwer gewinnen.

##### Euglenen

Als Vertreter dieser Gruppe wurde Euglena gracilis untersucht. Statt der ein bis zwei Chromatophoren wie bei den Dinoflagellaten, treten bei Euglena eine Vielzahl von Plastiden auf. In der Regel liegen diese Plastiden langgestreckt an der Zellwand, so daß bei Querbrüchen durch die Zelle ein ähnliches Bild wie bei Dinoflagellaten entsteht (Abb. 6). Die in den Chloroplasten befindlichen Membranen verlaufen in der Richtung der Längsachse des Chloroplasten von einem Ende zum anderen. Außerdem

ist zu erkennen, daß drei bis fünf Membranen einen Stapel bilden. Die Ordnung dieser Stapel ist jedoch nicht streng; denn vielfach kann beobachtet werden, daß einzelne Membranen den Stapel wechseln. Der Durchmesser einer paarigen Membran beträgt insgesamt 400 Å. Der partikuläre Bau der Membranen läßt sich nur an Flächenbrüchen klar nachweisen ( Abb. 8). Es ist zu erkennen, daß auf zwei nebeneinanderliegenden tangential angebrochenen Flächen Partikel lokalisiert sind. Die obere Fläche, als BP markiert, ist mit locker verteilten großen Partikeln besetzt, deren Durchmesser 180Å beträgt. Auf der anderen Fläche, als SP markiert, zeigen sich dicht gepackte kleine Partikel. Die Zahl der großen Partikel auf 0,1 $\mu^2$ beträgt etwa 6, während die kleinen Partikel in fast dreimal so großer Zahl, nämlich 33/0,1 $\mu^2$ , die andere Oberfläche besetzen. Da die beiden Flächen nebeneinander liegen und ein Tangentialbruch vorliegt, ist anzunehmen, daß beide Flächen in einem Stapel übereinander liegen und zwei Flächenansichten eines Thylakoids darstellen. Unklar ist allerdings die Zuordnung der Flächen zu dem Thylakoid.

## Grünalgen

### Befunde über die Ultrastruktur von Chloroplasten normal ergrünter Chlorellazellen

Als Vertreter der Gattung Chlorella wurden Chl. saccharophila und Chl. pyrenoidosa untersucht. Von den beiden Chlorella-Arten eignete sich Chlorella saccharophila für die Aufklärung der Chloroplastenstruktur besonders gut, weil in dieser Art meist nur ein einziger großer Chloroplast vorhanden ist. In Abb. 9 ist zu erkennen, daß der Chloroplast halbmondförmig einen großen Teil der Zelle einnimmt.

In Abb. 9 sind als weitere Organellen der Kern (N), eine Vakuole (V) und ein Mitochondrion (M) zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu befinden sich in einer Zelle von Chlorella pyrenoidosa eine Vielzahl kleiner Plastiden, in denen zudem noch ein großes Pyrenoid vorhanden ist, so daß die Wahrscheinlichkeit, bei dem Bruchprozeß Oberflächen freizulegen, gering ist. Daher stützen sich unsere Ergebnisse über den Bau der Thylakoide im wesentlichen auf Chlorella saccharophila.

Der große Plastid ist immer von einer doppelten Hülle begrenzt, wie Abb. 10 erkennen läßt. Die Membranen durchlaufen, ähnlich denen von Euglena, den gesamten Chloroplasten. Meist sind sie zu 4 - 5 gestapelt und lassen zwischen den Stapeln ein körniges Stroma erkennen. Auch hier ist die Ordnung der Stapel dadurch gestört, daß Membranen aus verschiedenen Stapeln sich zu sogenannten Pseudograna vereinigen. Einschlüsse ( Stärke, Pyrenoid u.a.) sind nur selten anzutreffen. Meist kann das Vorhandensein von Einschlüssen nur indirekt aus dem Auseinanderweichen der Membranen geschlossen werden. Eine Innenstruktur in angebrochenen Pyrenoiden konnte nicht identifiziert werden.

Die Periode der Membranen in einem Stapel beträgt 200-250 Å. Auch hier ist in Querbrüchen durch Membranen ein partikulärer Bau nur angedeutet zu erkennen; erst in Flächenbrüchen, in denen die Oberfläche der Thylakoidmembranen freigelegt sind, können Partikel deutlich unterschieden werden ( Abb. 10 und 11).

Dabei lassen sich auf verschiedenen Flächen wieder zwei Partikeltypen unterscheiden:

eine Fläche mit großen Partikeln ( BP ) und
eine Fläche mit kleinen Partikeln ( SP ).

Wenn man annimmt, daß die beiden Partikelflächen verschiedenen Ansichten der Thylakoidmembran entsprechen, müßten in Tangentialbrüchen BP-und SP-Flächen abwechselnd aufeinanderfolgen. In Abb. 10 ist dies auch zu erkennen. Da die Grenzen zwischen den Flächen immer aus hellen Linien bestehen und die Bedampfungsrichtung von unten nach oben verläuft, liegen die angebrochenen Flächen in Richtung von unten nach oben übereinander. Der Durchmesser der großen Partikel auf der Fläche beträgt 140 bis 160 Å. Bei höherer Auflösung ist zu erkennen, daß diese Partikel möglicherweise aus kleineren Einheiten aufgebaut sind (Abb. 11, Pfeil). Die Zahl der großen Partikel pro 0,1 $\mu^2$ Fläche beträgt 10. Diese Angabe bezieht sich nur auf den Teil der BP-Fläche, der mit großen Partikeln besetzt ist. Ein anderer Teil der Fläche ist glatt und ohne Partikel. Er ist ziemlich scharf gegen den partikelbesetzten Teil abgegrenzt, wie in Abb. 11 zu erkennen ist. Da aber zwischen dem glatten und partikelbesetzten Teil der BP-Fläche nie dunkle oder helle Linien, die bei Bedampfung von Kanten entstehen, zu unterscheiden sind, muß diese glatte Fläche zur BP-Fläche gehören.

Der zweite Typ von Partikeln, der die SP-Fläche besetzt, mißt 80-90 Å im Durchmesser. Diese kleinen Partikel sind auf der Oberfläche wesentlich dichter angeordnet, und zwar beträgt ihre Zahl im Durchschnitt 25/0,1 $\mu^2$. Eine periodische Anordnung dieser kleinen Partikel ist nicht zu erkennen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise auch diese Partikel aus Untereinheiten bestehen.

In einigen Präparaten konnte eine Verbindung des Thylakoidsystems mit der inneren Membran der doppelten Plastidenhülle beobachtet werden. Diese Verbindung deutet auf die bekannte Genese der Thylakoide durch Einfaltung der inneren Hüllmembran hin.

Die Ultrastruktur der Chloroplasten von gebleichten Chlorellazellen

Um zu klären, ob die beobachteten Partikel auf den Oberflächen der Thylakoide mit dem Chlorophyll in irgendeiner Beziehung stehen, sollten die Zellen der beiden Chlorella-Arten gebleicht werden. Am einfachsten war das nach der Methode von Shihira-Ishikawa und Hase ( 1964 ) durchzuführen. Dabei wurden die abzentrifugierten Chlorella-Zellen in eine Nährlösung, die keine Stickstoffquelle enthielt, gebracht. Statt dessen war in der Nährlösung ein Anteil von 3 % Glucose enthalten. Nach 10 Tagen waren die Zellen von Chlorella pyrenoidosa völlig entfärbt, während die Zellen von Chl. saccharophila selbst nach längerer Kulturdauer sich nicht völlig entfärben ließen.

Deshalb wurde bei dieser Art eine Entfärbung mit Streptomycin versucht. Auch mit dieser Methode konnten die Zellen von Chl. saccharophila nicht vollständig entfärbt werden, da die Zellen offenbar nur Konzentrationen von Streptomycin vertrugen, die keinen Bleicheffekt hatten. Daher wurden für die Untersuchung der Bleichwirkung nur die entfärbten Zellen von Chl. pyrenoidosa herangezogen. Zur Kontrolle, ob die Entfärbung reversibel ist, wurden die gebleichten Zellen wieder in Kulturlösung mit 1 % Harnstoff ohne Glucose überführt. Nach 8 Tagen waren die Zellen normal ergrünt. Daran ist zu erkennen, daß der Bleicheffekt reversibel ist.

Die elektronenmikroskopische Beobachtung von gefriergeätzten Präparaten der gebleichten Zellen ergab, daß die Ordnung des Thylakoidsystems degradiert worden ist. Denn in Übereinstimmung mit den Befunden von SHIHIRA-ISHIKAWA und HASE ( 1964 ) ist das Thylakoidsystem in konzentrischen Membranen angeordnet.

Eine parallele Anordnung der Thylakoide innerhalb eines Chloroplasten, wie sie für normale grüne Chloroplasten typisch ist, läßt sich nicht mehr erkennen. In Abb. 12 ist weiterhin zu beobachten, daß aber Reste von zahlreichen Thylakoiden offenbar noch partikuläre Baueinheiten aufweisen. Es scheint so, daß dieses Bild eine Zwischenstufe zur völligen Entfärbung darstellt ; denn in Abb. 13 lassen sich keine partikulären Membranreste unterscheiden. Es ist anzunehmen, daß hier der Bleichungsprozeß abgeschlossen ist, da allein konzentrisch angeordnete Membranen zu beobachten sind. Auffällig ist die große partikellose Fläche in der Mitte. Auch im Querschnitt der konzentrisch angeordneten Membranen gibt es keinen Anhaltspunkt für einen partikulären Aufbau. Die in der Mitte liegende große Membranfläche weist eine wabenähnliche Eigenstruktur auf.

Die wichtigste Erkenntnis der Untersuchungen über den Bleicheffekt ist der mögliche Zusammenhang zwischen Pigmentation und Partikelbesatz. Die Bleichwirkung äußert sich also darin, daß gleichermaßen makroskopisch erkennbare Pigmentation und elektronenmikroskopisch identifizierte Partikelstruktur verschwanden.

## Moose

Aus der nächsthöheren Klasse des pflanzlichen Systems, den Moosen, wurde Marchantia polymorpha auf den Bau der Chloroplasten hin untersucht. Ähnlich den Plastiden der Grünalgen verliefen auch bei Marchantia zu je 3-5 gepaarte Membranen durch den gesamten Chloroplasten. Auch hier war die Ordnung der dabei entstehenden Stapel durch hinzukommende und abzweigende Membranen gestört. Ähnlich wie bei den bisher untersuchten Organismen läßt sich auf den Querbrüchen der Thylakoide eine partikuläre Struktur nur angedeutet erkennen; erst in Flächenbrüchen sind auch hier beide Partikeltypen zu unterscheiden. Auf der Fläche BP sind wiederum locker verteilte große Partikel und auf der Fläche SP dicht gepackte kleine Partikel nachweisbar (Abb. 14). Die großen Partikel hatten einen Durchmesser von 140-160 Å, während die kleinen Partikel mit 90-100 Å vermessen wurden. Die Zahl der großen Partikel auf der Fläche BP betrug

9 - 10/0,1 $\mu^2$ und die der kleinen etwa 35/0,1 $\mu^2$. In ihrer Ultrastruktur lassen die Marchantia-Chloroplasten demnach keinen wesentlichen Unterschied zu den Chloroplasten der Grünalgen erkennen.

### Farne

Als Vertreter der nächsthöheren Klasse wurde Asplenium adiantum nigrum untersucht. Bei den Chloroplasten dieser Farnart waren auffällig häufig partikelbesetzte Oberflächen angebrochen. Die von den Grünalgen und Moosen her bekannten Oberflächentypen SP ( mit kleinen Partikeln ) und BP ( mit großen Partikeln ) wurden auch hier wieder angetroffen. In Abb. 15 sind beide Flächen angebrochen.

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Granabildung könnte die oft kreisförmige Anordnung der großen Partikel auf der Thylakoidoberfläche sein, die in Flächenbrüchen zutage tritt ( Abb. 15). Diese Form würde übereinstimmen mit der Form der Grana in der Aufsicht.

Der Durchmesser der großen Partikel beträgt 160 - 180 Å und eine Zahl von 10/0,1 $\mu^2$ bedeckt die Fläche BP. In Größe und Zahl pro Flächeneinheit sind sie also sehr ähnlich den bei Grünalgen und Moosen beschriebenen großen Partikeln. Auch hier gibt es hinweise, daß diese Partikel aus kleineren Einheiten aufgebaut sind. Ebenso stimmen die Oberflächen mit den kleinen Partikeln ( SP ) in qualitativer und quantitativer Hinsicht mit den in anderen Pflanzenklassen beschriebenen Strukturen etwa überein, denn ihr Durchmesser beträgt 80-100 Å und 35-38 Partikel kommen auf 0,1 $\mu^2$.

### Samenpflanzen

#### Befunde über die Feinstruktur des photosynthetischen Apparates mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens

Ein ähnlicher makromolekularer Bau der Thylakoidmembran wie bei Farnen, Moosen und Grünalgen wurde auch in Chloroplasten aus Gewebekulturen der Karotte gefunden. In Abb. 16 ist ein Chloroplast aufgebrochen, in dessem Inneren zahlreiche Thylakoidmembranen mit partikulärer Oberfläche erkennbar sind. Daneben ist auch eine größere Zahl kleiner sphärischer Einschlußkörper zu unterscheiden. Bei höherer Auflösung ist zu erkennen, daß auf den tangential angebrochenen Flächen wiederum zwei Typen von Partikeln identifiziert werden können: auf der Fläche SP die dicht gepackten kleinen Partikel und bei BP die locker verteilten großen Partikel. Der Durchmesser der großen Partikel beträgt 140-160 Å und der der kleinen 80-100 Å.

Eine periodische Anordnung der Partikel ließ sich auch bei den Thylakoiden dieser Zellen nie nachweisen. Quantitative Aussagen über die Zahl der beiden Partikeltypen pro Flächeneinheit sind vor allem an Chloroplasten möglich, in denen große Thylakoidflächen freigelegt sind. Hiernach beträgt

die Zahl der großen Partikel im Durchschnitt 9/0,1 $\mu^2$ und die der kleinen 37/0,1 $\mu^2$. Diese Werte stimmen in etwa überein mit den in anderen Pflanzen gefundenen Verhältnissen.

Die mit Hilfe der Gefrierätztechnik erhaltenen Befunde geben ein Bild von dem partikulären Bau der einzelnen Thylakoidmembran. Schwieriger scheint es jedoch, sich mit Hilfe dieser Methode eine klare Vorstellung über die Anordnung der Einzelthylakoide in einem Chloroplasten zu verschaffen, da die Verschiedenartigkeit der Brüche in dem photosynthetischen Apparat eine Übersicht erschwert. Auch über die Natur der Einschlußkörper können nur schwer Informationen erhalten werden, da mit dieser Methode naturgemäß nicht verschiedene chemische Strukturen selektiv angefärbt werden können. Für die Klärung solcher Fragen sollte daher die Dünnschnitt-Technik hinzugezogen werden.

Untersuchung der Chloroplasten von Karottengewebekulturen mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik

Als Fixierungsmittel für die Daucus-Kulturen wurden $OsO_4$, $KMnO_4$ und Glutaraldehyd mit nachfolgendem $OsO_4$ benutzt. Die nachfolgende Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Von allen getesteten Einbettungsmitteln erwies sich Epon ( nach KUSHIDA, 1966 ) am geeignetsten. Auch Maraglas ergab befriedigende Resultate, während bei Einbettung in Benzin-Methacrylat häufig Schrumpfungen der Chloroplasten zu beobachten waren. Methacrylat, Araldit, Plexigum, Vestopal und Epon nach LUFT ( 1961 ) waren als Einbettungsmittel für die Gewebekulturen ungeeignet. Die Erklärung hierfür könnte sein, daß Vestopal, Araldit und Epon nach LUFT ( 1961 ) stärker viskos sind als Epon nach der Rezeptur von KUSHIDA sowie auch Maraglas. Daher dringen letztere besser in die hochvakuolisierten und mit dicken Wänden versehenen pflanzlichen Gewebe ein.

Die Plastiden der eingebetteten Gewebe ließen häufig eine "Anpassung" an die parenchymatischen Zellen mit ihrem schmalen Plasmasaum erkennen, da sie meist eine langgestreckte Form besitzen. Oftmals befinden sich nur wenige Thylakoide in einem Chloroplasten ; eine Granastruktur läßt sich dann nicht feststellen (Abb. 18 ). Bei höherer Auflösung ist zu beobachten, daß ein Thylakoid bei Permanganatfixierung aus einer stark kontrastierten Mittelzone und beidseitig aufsitzenden Partikeln zu bestehen scheint (Abb. 19). Dieses Erscheinungsbild kann damit erklärt werden, daß die dunkel kontrastierten Wände der Partikel zweier nebeneinander liegender Einzelthylakoide in den Grana sich berühren, und damit den Eindruck der dunkelkontrastierten Trägerlamelle hervorrufen. Eine Endgranalamelle ist 80-85 Å breit und eine "Doppelmembran" in den Grana, die aus zwei " unit membrane" benachbarter Einzelthylakoide besteht ( = " partition "), mißt 140-150 Å, also weniger als das Doppelte einer Einzelmembran. Diese Messungen

lassen sich nur schwer mit denen, die mit Hilfe der Gefrierätzung erzielt wurden, in Einklang bringen, da in den Schnittbildern weder die beiden Partikeltypen noch eine echte Trägermembran erkennbar sind. Dagegen läßt sich die Natur der Einschlüsse eher mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik als mit der Gefrierätztechnik analysieren. So erschienen die Stärkekörner der Chloroplasten immer transparent, während nach $OsO_4$-Fixierung zusätzlich noch osmiophile Granula als stärker kontrastierte Körner identifiziert werden konnten. Auch ließ sich in Dünnschnitten oft eine Verbindung des Thylakoidsystems mit der inneren Membran der Plastidenhülle beobachten.

Die Befunde, die mit Hilfe der beiden Methoden erhalten wurden, differieren also erheblich voneinander.

Ultrastruktur der Chloroplasten in normalen pflanzlichen Geweben

Um zu kontrollieren, ob die Struktur der Chloroplasten aus den Daucus-Gewebekulturen den natürlichen Verhältnissen in Blättern entspricht, wurden Teile von Primärblättern von Karottenpflänzchen untersucht. Es zeigten sich in Flächenbrüchen eine Vielzahl von Thylakoiden, die ebenfalls partikulär aufgebaut sind ( Abb. 20). Dabei lassen sich wieder Flächen mit großen Partikeln ( BP ) und Flächen mit kleinen Partikeln (SP ) voneinander unterscheiden. Im Bau der Thylakoidmembran sind also keine signifikanten Unterschiede zwischen den Chloroplasten der Gewebekulturen und den von excisierten Blattgeweben festzustellen.

Im Vergleich dazu wurden auch Plastiden aus den Samenanlagen von Rhinanthus alectorolophus untersucht. Diese Chloroplasten wiesen viele Einschlüsse auf ( Abb. 21 ). Diese Einschlüsse sowie die meist geringe Zahl von Thylakoiden lassen die Vermutung zu, daß es sich bei diesen Plastiden um Leukoplasten handelt, die sich im Stadium des Ergrünens befinden. Für diese Annahme spricht auch die Herkunft der Plastiden, die ja aus Samenanlagen stammen.

### Mitochondrien

Während sich in den Chloroplasten der untersuchten pflanzlichen Organismen stets ein partikulärer Bau der inneren Membranen nachweisen ließ, gelang das in Mitochondrien nur in einigen ausgewählten Objekten ( vergl. Literaturübersicht). So konnten Partikel auf inneren Mitochondrienmembranen in den von uns untersuchten Organismen nur bei Chlorella saccharophila beobachtet werden. Der Durchmesser der Partikel betrug 90 - 100 Å und liegt somit interessanterweise in der Größenordnung der kleinen Partikel der Chloroplasten.

Bei höheren Pflanzen konnte ein partikulärer Bau der inneren Mitochondrienmembranen nur andeutungsweise identifiziert werden. In Schnittbildern war zu erkennen, daß die Mitochondrien der Daucus-Gewebekultur tubulär aufgebaut sind ( vergl. Abb. 18).

In gefriergeätzten Präparaten von FL-Zellen erschienen die Mitochondrien reich gegliedert. Eine partikuläre Struktur ließ sich jedoch nicht feststellen.

Somit war es leider nicht möglich, die Mitochondrien in unsere vergleichenden Untersuchungen an Membransystemen mit einzubeziehen.

## II. Plasmamembranen

### 1. Kernmembran

Während die inneren Chloroplasten - und Mitochondrienmembranen eine spezielle Funktion im Zellstoffwechsel erfüllen, stellt die Kernmembran eine Grenzmembran zwischen Kern und Cytoplasma dar, die offenbar keine spezialisierte Stoffwechselfunktion innehat.

Um die Frage zu klären, ob sich zwischen den verschiedenen systematischen Kategorien der Organismen in Bezug auf den Bau ihrer Kernhülle Unterschiede nachweisen lassen, wurden Organismen aus einigen Stämmen des Pflanzen - und Tierreiches vergleichend untersucht.

Von besonderem Interesse mußte eine Untersuchung der Kernmembran bei Dinoflagellaten sein ; denn diese Organismen sollen phylogenetisch zwischen den Bakterien, die " noch " keine Kernhülle besitzen, und den höheren Organismen mit Kernmembran stehen ( GIESBRECHT, 1966).

#### Dinoflagellaten

Die Kernoberfläche der drei untersuchten Dinoflagellaten Gymnodinium spec., Amphidinium carteri und Prorocentrum micans hat ein charakteristisches Aussehen, denn die die Kernhülle perforierenden Poren sind nich

statistisch über die gesamte Oberfläche verteilt, sondern in Gruppen angeordnet (Abb. 22). In einer Ausschnittvergrößerung (Abb. 23) ist zu erkennen, daß die Poren innerhalb einer Gruppe nach einem bestimmten Prinzip geordnet sind. Da sich drei Achsen durch eine Porengruppe legen lassen, müssen die Poren nach einem hexagonalen Muster geordnet sein. Doch diese hexagonale Ordnung ist nicht allein auf die räumliche Beziehung der Poren untereinander beschränkt, sondern tritt auch in einer Pore selbst zutage. An günstig gebrochenen Oberflächen ist nämlich zu erkennen, daß die Pore, ähnlich einer Bienenwabe, von 6 Kanten begrenzt ist. Innerhalb einer Pore sind meist 5-9 "Partikel" erkennbar. Der Durchmesser einer Pore variiert von 870-1050 Å. Der Abstand zwischen zwei Poren in einer Gruppe ist klein. Er beträgt nur 1000-1300Å. Daraus ergibt sich eine große Zahl von Poren auf der Kernoberfläche in dem Bereich einer Porengruppe (60-70/$\mu^2$). Die absolute Zahl der Poren einer Kernhülle wird auf 500-800, je nach Organismus, geschätzt. Diese quantitativen Aussagen sind mit Hilfe der Methode der Gefrierätzung möglich, weil relativ große Oberflächen durch den Vorgang des Brechens freigelegt werden und somit eine Auswertung ermöglichen. Die Kernhülle scheint aus einer Doppelmembran zu bestehen, wie es sowohl im Querschnitt als auch in Flächenbrüchen offenbar wird (Abb. 24). In Abb. 24 ist die innere Kernmembran (INM) durch Herausbrechen der äußeren Membran freigelegt. Von der äußeren Membran sind nur Reste vorhanden. Die Poren bilden sich in dieser äußeren Kernmembran (ANM) nur schwach ab.

## Euglenen

Nach der Auffassung von GIESBRECHT (1966) gehört Euglena zu einer systematisch höher stehenden Gruppe von Organismen als die Dinoflagellaten. Daher interessierte es besonders, ob auch hier die Kernmembran die ungewöhnliche hexagonale Anordnung der Kernporen aufwies wie bei den untersuchten Dinoflagellaten.

In den Gefrierätzpräparaten lassen sich die beiden Membranen der Kernhülle gut voneinander unterscheiden. Bei einem Vergleich der Kernoberfläche mit der der Dinoflagellaten fällt auf, daß die Kernporen bei Euglena zwar weniger streng in Gruppen geordnet sind (Abb. 25), doch läßt sich auch hier deutlich eine hexagonale Symmetrie der Kernporen auf der Oberfläche erkennen (Abb. 26, Pfeile). Auch innerhalb einer Pore läßt sich eine hexagonale Symmetrie rekonstruieren, wenn auch nicht so deutlich wie bei den Dinoflagellaten.

Der mittlere Durchmesser der Kernporen beträgt 950 Å, der Abstand der Poren voneinander im Mittel 1700 Å. Die Zahl der Partikel innerhalb einer Pore variiert von 7-9. Auf der Kernoberfläche ist die Zahl der Kernporen mit 35/$\mu^2$ ausgezählt worden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Kernhülle der Euglenen " noch " viele gemeinsame Strukturmerkmale mit der der Dinoflagellaten besitzt.

## Grünalgen

Die Kernhülle der Grünalgen läßt kaum Übereinstimmung mit der der hier untersuchten Flagellaten erkennen. Der wesentliche Unterschied besteht in der Anordnung der Poren, die hier keine Anordnung zu Gruppen mehr erkennen lassen, sondern statistisch über die gesamte Kernoberfläche verteilt zu sein scheinen (Abb.27). Eine hexagonale Ordnung ist daher nicht rekonstruierbar und der Abstand zwischen zwei Poren erheblich vergrößert. Er beträgt im Durchschnitt 2800 Å. Die Zahl der Poren beträgt $10/\mu^2$. Der Durchmesser der Poren schwankt zwischen 950 - 1250 Å. Eine Symmetrie innerhalb einer einzelnen Pore konnte nicht festgestellt werden. Die Zahl der Partikel in einer Pore war sehr unterschiedlich. Die absolute Zahl der Poren einer Kernoberfläche bei Chlorella wird auf 30 - 60 geschätzt.

## Penicillium

Die Kernhülle dieses Pilzes ist kaum von der der Grünalgen zu unterscheiden. Auch hier besteht sie aus zwei Membranen und die Poren sind statistisch über die gesamte Oberfläche verteilt. Der Abstand voneinander beträgt durchschnittlich 2600 Å. Für den Durchmesser der Poren wurden 830 - 1000 Å gemessen und für die Zahl der Poren $10/\mu^2$. Eine Symmetrie innerhalb der Poren und untereinander war wie bei Grünalgen nicht festzustellen. Die Zahl der Poren auf der gesamten Kernoberfläche wird auf 30 - 60 geschätzt.

## Asplenium

Bei diesem Farn sind die Poren regelmäßiger als bei den Grünalgen und Penicillium über die gesamte Kernoberfläche verteilt. Große porenlose Flächen sind bei diesem Organismus nicht mehr festzustellen (Abb.28). Der Durchmesser einer einzelnen Pore beträgt 830-1000 Å , und der Abstand voneinander etwa 2700 Å im Durchschnitt. Übereinstimmend zu den bisher erwähnten Arten besteht auch hier die Kernhülle aus einer Doppelmembran (Abb. 28 ). Innerhalb der Poren sind Partikel zu unterscheiden, deren Zahl nicht konstant zu sein scheint. Die absolute Zahl der Poren eines Kerns wird auf 700 - 900 geschätzt.

## Daucus und Crocus

Auch in den Gewebekulturzellen von Daucus carota und Crocus kotschyanus ist das schon bekannte Bild einer doppelten Kernhülle anzutreffen. In Abb. 29 wurde der Kern einer Zelle von Crocus angebrochen. Deutlich kann die Bruchkante verfolgt werden, die die Grenze zwischen äußerer und innerer Kernmembran markiert. An einer Stelle ist die Kernhülle völlig weggebrochen und ein Teil des Nucleoplasmas freigelegt. Auffallend ist, daß in diesem Typ von embryonalen Zellen der Kern im Vergleich zur Zelle relativ groß ist. Typisch ist außerdem für diese embryonalen Zellen die meist kugelige Form des Kerns. Dagegen ist er in vakuolisierten Zellen mit mehr oder weniger schmalem Plasmasaum langgestreckt gestaltet; eine Anpassung an die Eigenart des Zelltyps ( Abb. 30). Da die Kerne von Crocus und Daucus im Bau ihrer Kernhülle keine Unterschiede erkennen lassen, gelten die hier gemachten Angaben für beide Arten.

Die Poren sind statistisch über die gesamte Kernoberfläche verteilt (Abb. 30). Ein Ordnungsprinzip ist nicht zu erkennen. Auch die einzelne Pore ist offenbar nicht symmetrisch gebaut. Der Porendurchmesser schwankt in einem breiten Bereich zwischen 850 - 1600 Å.

Möglicherweise richtet sich der Durchmesser der Poren nach dem physiologischen Zustand der Zelle, denn in aktiven ist er größer als in ruhenden Zellen. Man könnte daher vermuten, daß das Kernmaterial in aktiven Zellen aus den Poren mehr oder weniger stark austritt. Mit dieser Annahme ließe sich der in Gefrierätzpräparaten zu beobachtende oft stark variierende Porendurchmesser erklären. Sogar auf der Oberfläche eines einzigen Kerns lassen sich Aktivitätsunterschiede ableiten. So ist in Abb. 31 zu erkennen, daß einige "aktive" Poren mit starkem Austritt von Kernmaterial (siehe Pfeile) von Poren mit kleinerem Durchmesser umgeben sind. Der granuläre Poreninhalt dürfte wohl kaum eine Strukturеigentümlichkeit der Poren sein, sondern muß eher als austretender Kerninhalt angesehen werden.

Auch mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik können Kernporen dargestellt werden ( Abb. 32).

Die absolute Zahl der Poren eines Kerns richtet sich nach dem Zelltyp. In embryonalen Zellen wurde die Zahl der Poren pro Kern auf 2500 geschätzt, während ihre Zahl in parenchymatischen, hochvakuolisierten Zellen meist nicht höher als 200 ist. Neben dem veränderten Porendurchmesser ist dies ein weiterer Hinweis auf eine physiologische Aktivität der Zelle.

Ein morphologischer Ausdruck für die Beziehung des Kernes mit dem Plasma ist die Verbindung der Kernhülle mit dem endoplasmatischen Retikulum ( ER ). In der Mitte der Abb. 33 ragt das ER, das mit dem Kern

in Verbindung steht, als aufgeblähter Schlauch in das Plasma hinein (Pfeil). Auch in Dünnschnittbildern kann eine Verbindung des ER mit der Kernhülle nachgewiesen werden (Abb. 18, Pfeile). Im Unterschied zu den oben erwähnten "aktiven " Poren mit austretendem granulären Kerninhalt sind bei diesem schlauchförmigen Kontakt zwischen ER und Kernhülle stets Teile der ER-Membranen angebrochen (Abb. 33).

## FL-Zellen

Um zu untersuchen, ob Unterschiede im Bau der Kernhülle von Pflanzen und Tieren bestehen, wurden zum Vergleich mit unseren pflanzlichen Gewebekulturen die menschlichen Gewebekulturen von FL-Zellen untersucht. Diese Zellen zeigten den schon von pflanzlichen Objekten her bekannten Bau der Kernhülle mit einer doppelten Kernmembran. In Abb. 34 sind Reste der äußeren Membran am Rande des Kerns erhalten (charakteristisch sind die etwas eingesenkten Poren), während zur Mitte hin, wo die äußere Membran weggebrochen ist, die innere Membran mit typisch erhabenen Poren freigelegt ist. Die Kerne sind oft riesenhaft und nehmen teilweise den größten Teil der Zelle ein. Meist ist der Kern gelappt. Besondere Strukturen ließen sich im Kernplasma nicht feststellen. Ebenso wie bei den höheren Pflanzen sind die Kernporen statistisch über die gesamte Kernoberfläche verteilt und lassen kein Ordnungsprinzip erkennen. Eine konstante Zahl von Partikeln innerhalb der Poren, die auf ein Vorkommen von Subannuli hinweisen könnte, ist nicht festzustellen.

Eine solche Eigenstruktur der Pore, die auch die Porensymmetrie betrifft, könnte jedoch durch das austretende Kernmaterial maskiert sein. In Abb. 35 ist dieses austretende Kernplasma im Querbruch zu beobachten ( siehe Pfeile). Dieser pilzförmige Austritt ist bei verschiedenen Poren durchaus nicht gleichmäßig, wie in Abb. 35 zu erkennen ist. Das läßt sich nur damit erklären, daß die Poren eines Kernes, wie schon erwähnt, unterschiedliche Transportleistungen aufweisen.

Die Messungen des Porendurchmessers bei den FL-Zellen liegen bei 830-1100 Å. Der Abstand zweier benachbarter Poren voneinander beträgt im Durchschnitt 2400 Å und die Zahl der Poren $20/\mu^2$. Damit ergibt sich etwa eine Zahl von 2500-3000 Poren pro Kern.

Die Struktur der doppelten Kernmembran bei den FL-Zellen läßt erkennen, daß keine prinzipiellen Unterschiede zu der Kernhülle der höheren Pflanzen existieren. Damit scheint erwiesen, daß die Kernhülle zumindest bei höheren Pflanzen und Tieren nach einem einheitlichen Bauplan aufgebaut ist.

## 2. Cytoplasmamembran

### a. Ultrastruktur

Während die Kernmembran das Kernplasma vom Cytoplasma abgrenzt, umgibt die Cytoplasmamembran ( CM ) den gesamten Protoplasten. Als ausgedehnte Grenzmembran wurde sie bei der Gefrierätzung verhältnismäßig häufig freigelegt.

Sowohl bei Dinoflagellaten als auch bei Euglenen bereitet es Schwierigkeiten, die freigelegten peripheren Oberflächenstrukturen der Cytoplasmamembran zuzuordnen. So ließen sich z.B. bei Euglenen innerhalb der Pellikula (vergl. Übersicht Abb..41 ) drei verschiedene übereinanderliegende Oberflächen unterscheiden ( Abb. 42 ):

1. eine glatte strukturlose Fläche,
2. eine partikuläre Zwischenschicht

und 3. eine aus kettenförmig angeordneten Makromolekülen ( Pfeile) ( Durchmesser 30 Å ) mit einer Periode von 60 - 70 Å bestehende Membranstruktur.

Im Gegensatz zu den beiden Flagellaten ist die CM bei anderen Organismen leichter zu identifizieren, da sie einerseits vom Cytoplasma, andererseits von der fibrillären Zellwand begrenzt wird. Dies kann z.B. bei Chlorellazellen beobachtet werden. In Abb. 36 ist neben der fibrillären Zellwand und Teilen des Cytoplasmas die Cytoplasmamembran freigelegt.

Im Gegensatz dazu wies die CM von Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, keine länglichen, sondern ringförmige Invaginationen auf ( Abb. 37). Das Innere der Ringe trat in unterschiedlichem Maße aus der CM heraus und war auch teilweise angebrochen, so daß der Eindruck von aufgebrochenen Bläschen entstand. Es bestand also betreffs der Invaginationen ein deutlicher Unterschied zwischen ruhenden und aktiven Zellen.

Eine verblüffende Ähnlichkeit mit der Cytoplasmamembran von ruhenden Zellen dieser Grünalge besitzt die CM der untersuchten Penicillium-Art ( Abb. 38).

Auch in Schizosaccharomyces pombe, einer Hefeart, ließen sich Invaginationen nachweisen, die aber im Gegensatz zu den bisher erwähnten Typen wesentlich länger waren ( Abb. 39).

Bei allen anderen untersuchten Organismen konnte diese Besonderheit im Bau der CM nicht beobachtet werden. So erscheint die CM von pflanzlichen Gewebekulturzellen ( Abb. 1.31) und menschlichen Gewebekulturzellen ( Abb. 40 ) ohne diese typischen Invaginationen.

In einigen Fällen tritt die Eigenstruktur der CM in Erscheinung ( Abb. 40). Dabei kann, ähnlich der Thylakoidmembran in gebleichten Chlorellazellen ( vergl. Abb. 12 und 13), ein schwach hervortretendes fibrilläres Netzwerk identifiziert werden.

Außerdem kann auf verschiedenen freigelegten CM-Flächen ein Partikelbesatz festgestellt werden.

So sind Partikel auf der CM von Chlorella, allerdings in geringer Dichte, lokalisiert. Auch auf der CM von Ze llen aus Rhinanthus-Embryonen läßt sich ein zum Teil dichter Partikelbesatz beobachten ( vergl. Abb. 31). Dage gen scheint in hoch vakuolisierten pflanzlichen Gewebekulturzellen die CM, wenn überhaupt, nur mit wenigen Partikeln besetzt ( Abb. 1 ) . Ebenso fehlen Partikel auf der CM von tierischen Zellen ( Abb. 40).

Somit können drei strukturelle Besonderheiten der Cytoplasmamembran unterschieden werden:

1. Invaginationen,
2. fibrilläre netzartige Eigenstruktur

und 3. Partikelbesatz.

Die Cytoplasmamembran schließt in pflanzlichen Zellen den Protoplasten von der Zellwand ab.

Die Struktur der Zellwand läßt sich vor allem in Flächenbrüchen durch Gewebekulturzellen von Daucus und Crocus mit Hilfe der Gefrierätztechnik darstellen. Neben häufig zu beobachtenden Primärwänden mit Streutextur, b der die Zellulosemikrofibrillen scheinbar regellos in die Matrix eingebettet sind, können auch paralleltexturierte Sekundärwände beobachtet werden. Da bei war die scharfe Trennung zwischen Streu-und Paralleltextur bemerkenswert ( Abb. 43). Innerhalb der paralleltexturierten Wände fällt auf, daß die flachen Lamellenbündel, die aus Zellulosefibrillen bestehen, in bestimmten Winkeln übereinanderliegen ( gekreuzte Paralleltextur ) ( Abb. 44 ).

Ein ähnlicher Bau der Zellwand konnte auch bei Penicillium festgestellt werden ( vergl. Abb. 38). Im Unterschied zu den Samenpflanzen besteht das Stützgerüst dieser Zellwand jedoch aus Chitinfibrillen.

Diese Gefrierätzbefunde an Zellwänden erscheinen insofern bemerkenswert, als mit bisher angewandten elektronenmikroskopischen Präparationsverfahren entweder die Zellwandstruktur überhaupt nicht dargestellt werden konnte ( Dünnschnitt-Technik ; vergl. auch FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER 1965) oder man war gezwungen, von isolierten und macerierten Zellwänden auszugehen, um die Methoden der Negativkontrastierung (MÜHLETHALER, 1960 b) oder der Beschattung ( FREY-WYSSLING et. al., 1948) anwenden zu können. Im Gegensatz dazu ist mit Hilfe der Gefrierätztechnik erstmalig die Darstellung von intakten Wänden aus latent lebenden Zellen möglich.

## Golgi-Apparat

Um zu untersuchen, ob sich ähnlich wie bei anderen Membransystemen auch in der Ultrastruktur des Golgi-Apparates mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens neue Erkenntnisse gewinnen lassen, wurde der Golgi-Apparat verschiedener Organismen verglichen.

Im Prinzip ist der Bau des Golgi-Apparates bei den untersuchten pflanzlichen Objekten verschiedener systematischer Kategorien ähnlich. Bei Euglena gracilis ist im Unterschied zu anderen Organismen die Zahl der gestapelten bläschenbildenden Zisternen besonders hoch (Abb. 45). Es lassen sich im Durchschnitt 12-15 Zisternen pro Golgi-Apparat feststellen. Bei Grünalgen beträgt ihre Zahl nur 5-7. Diese Zahl ist auch für höhere Pflanzen charakteristisch (Abb. 51). In Abb. 46 liegen zwei Ansichten eines Golgi-Apparates dicht nebeneinander. Auf der linken Bildseite ist ein Querbruch, auf der rechten eine Aufsicht zu erkennen. Charakteristisch sind die in der Aufsicht gut zu unterscheidenden peripärwärts an Volumen zunehmenden, sich schließlich abschnürenden Bläschen.

In FL-Zellen ist die im Querschnitt für pflanzliche Zellen typische Struktur der Golgi-Apparate etwas modifiziert, denn der Zentralkörper, auf dem die Zisternen aufliegen, ist sehr stark vergrößert.

## Multivesicular Bodies

Ein Organell , das funktionell mit dem Golgi-Apparat möglicherweise in enger Beziehung steht, stellen die Multivesicular Bodies (MVB) dar.

Besonders auffällig war das Auftreten der MVB in Euglena gracilis ( Abb. 6). Hier ist zu erkennen, daß der multivesikuläre Körper von einer Hülle umgeben ist, von der ein Teil noch erhalten ist. In dem aufgebrochenen Teil sind verschieden große kugelige Körper in eine Matrix eingebettet. Charakteristisch ist, daß sich die Bläschen in die umgebende Membran eindrücken, so daß solche Bilder wie in Abb. 47 entstehen. Hierbei ist bis auf wenige Vesikel der Inhalt des MVB herausgerissen und nur der untere Teil der umgrenzenden Membran erhalten. Diese Deutung ergibt sich bei Berücksichtigung der Bedampfungsrichtung, die durch einen Pfeil markiert wurde. Da der vordere Teil bis auf die herausragenden Bläschen ohne Kontrast ist, muß angenommen werden, daß er im Bedampfungsschatten liegt, also in der Replica als Vertiefung vorhanden ist. Oftmals entsteht der Eindruck, als bestände die Hülle aus zwei Membranen.

Neben den Bläschen kommen auch membranöse Strukturen vor (Abb. 48, siehe Pfeil). In Abb. 48 ist auch ein Transport der Bläschen durch die Wandung zu erkennen ( großer Pfeil ). Die Frage nach der Funktion dieses Organells ist an Hand der statischen Bilder nur schwer zu beantworten. Ein Hinweis wäre die meist unmittelbare Nachbarschaft eines Golgi-Apparates, die eine physiologische Beziehung dieser beiden Strukturen vermuten läßt (Abb. 49).

Ähnliche mit Bläschen gefüllte Säckchen wurden auch in höheren Pflanzen beobachtet. Allerdings sind diese Säckchen mit einer Vielzahl von mehr oder weniger gleich großen Bläschen gefüllt ( Abb. 50). An einer Stelle, in Richtung zum Plasma hin, ist die MVB - Hülle, die wahrscheinlich aus einer Doppelmembran besteht, geplatzt. Eine Funktion der MVB läßt sich aus dem verfügbaren Material nur schwer ableiten.

Der Typ MVB mit Bläschen sehr unterschiedlicher Größe findet sich auch wieder in den FL - Zellen, also Geweben menschlichen Ursprungs ( Abb. 51).

Einige Anzeichen deuten darauf hin, daß diese bläschengefüllten Säckchen mit autolytischen Vorgängen in der Zelle in Verbindung stehen ; denn oftmal ist zu erkennen, daß der MVB in Richtung zur Zellmembran hin geöffnet ist, und möglicherweise die Bläschen entläßt, die dann durch die Zellmembran hindurch in das umgebende Medium wandern. Man könnte vermuten, daß die MVB von den Orten der Autolysis zur Zellgrenze hingelangen und dort ihre Abbauprodukte die Zellmembran passieren.

Trotz ähnlicher Morphologie der MVB in Euglena, höheren Pflanzen und tierischen Geweben ist daher nicht klar, ob auch identische Funktionen anzunehmen sind.

## Diskussion

### Der Gefrierschutz von Organismen verschiedener systematischer Stellung

Der weitaus größte Teil der bisher vorliegenden Untersuchungen über Gefrierschutz von Zellen und Geweben befaßt sich mit einer Gefrierkonservierung; d.h. die Zellen werden in der Regel unter Zusatz von Gefrierschutzmitteln bei niedriger Gefriergeschwindigkeit langsam ( unter $1^{o}$ C pro Minute ) eingefroren. Mit dieser Methode kann eine ganze Reihe von Zellen und Geweben der verschiedensten Organismen konserviert werden ( siehe Literaturübersicht ). Der große Nachteil dieser Methode für unsere Feinstrukturuntersuchungen mit Hilfe der Gefrierätztechnik ist jedoch, daß die Zellen durch das extrazelluläre Gefrieren sehr viel Wasser verlieren und stark schrumpfen. So nahmen Hefezellen um die Hälfte ihres Volumens ab ( MOOR 1964). Deshalb ist allein ein rasches Einfrieren der Zellen geeignet, die Zellstrukturen in latent lebendem Zustand zu erhalten. Bei den von uns zum Einfrieren benutzten , mit flüssigem Stickstoff gekühlten Freon lag die Temperatur zwischen - $140^{o}$ und - $150^{o}$ C und die Gefriergeschwindigkeit betrug etwa $100^{o}$ C/sec. (Vergl. MOOR, 1964 ). Für die vegetativen Zellen reicht diese Gefriergeschwindigkeit nicht aus. Sämtliche eingefrorenen Zellen ohne Frostschutz waren durch Eiskristallbildung zerstört. Daher war die Anwendung von Gefrierschutzmitteln unumgänglich, um das Intervall zwischen Gefrierpunkt und Rekristallisationspunkt, indem die zerstörende Eiskristallbildung erfolgt, möglichst einzuschränken. Das Erreichen eines ausreichenden Gefrierschutzes hing, wie sich zeigte, von einer ganzen Reihe von Faktoren ab. Neben den beiden schon erwähnten äußeren Faktoren der Gefriergeschwindigkeit und des Frostschutzmittels wird der Ablauf des Gefriervorganges in den Zellen auch von objektgebundenen Faktoren beeinflußt.

Zu diesen objektgebundenen Faktoren rechnet MOOR (1964 ) den Gefrier - punkt, die Unterkühlbarkeit und den Rekristallisationspunkt der Zelle. In unseren Untersuchungen zeigte sich, daß diese drei genannten inneren Faktoren ihrerseits abhingen erstens von den natürlichen Umweltbedingungen des einzufrierenden Objektes und zweitens von dem physiologischen Zustand der Zellen.

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Wichtigkeit der natürlichen Umwelt auf den Gefrierschutz des betreffenden Organismus fand sich innerhalb der Gruppe der Dinoflagellaten. Die drei untersuchten Arten ließen sich in zwei Gruppen aufteilen. Zu der ersten Gruppe gehörten Amphidinium carteri und Gymnodinium spec. Da beide Arten nicht mehr als 1,6 - 1,8 Osmol tolerierten, konnte Glycerin als Frostschutzmittel nicht verwendet werden, da die schützenden Konzentrationen wesentlich über der verträglichen Osmolgrenze liegen. Der Grund für dieses Verhalten der beiden Dinoflagellaten ist offenbar in dem natürlichen Standort der beiden Arten, dem offenen Meer, zu suchen. In diesem Biotrop herrschen nämlich konstante osmotische Verhältnisse und die Organismen sind daran angepaßt.

Eine wesentlich höhere osmotische Toleranz wies der zur zweiten Gruppe gehörende Dinoflagellat Oxyrrhis marina auf. Von diesem Organismus wurden nämlich noch 20 % Glycerin in Meerwasser toleriert. Das wird wiederum verständlich, wenn der natürliche Standort von Oxyrrhis untersucht wird. Dieser Dinoflagellat besiedelt als Biotop im Unterschied zu den beiden anderen Arten die Gezeitenzone und ist hier starken Salzgehaltsschwankungen ausgesetzt. Denn bei Ebbe kann in den zurückbleibenden Tümpeln das Meerwasser sowohl durch starke Sonneneinstrahlung konzentriert als auch durch Regenwasser verdünnt werden. Damit ist Oxyrrhis hohen osmotischen Schwankungen ausgesetzt. Von BIEBL ( 1967) wurde nachgewiesen, daß dieser Dinoflagellat noch die dreifache Meerwasserkonzentration toleriert. Diese hohe osmotische Toleranz, die mit den natürlichen Lebensbedingungen verknüpft ist, ermöglichte die Verträglichkeit von 20 % Glycerin, das den osmotischen Wert des Meerwassers erheblich erhöhte.

Eine gleichfalls hohe osmotische Toleranz zeichnete Penicillium spec. aus denn der Pilz wuchs noch in Glycerin-Kokosnußmilchlösungen mit 3,8 Osmol. Desgleichen schienen die pflanzlichen Gewebekulturen hohe osmotische Werte des Gefrierschutzmittels zu tolerieren, während die menschlichen FL-Zellen und auch Euglenen empfindlicher auf Veränderung der osmotischen Verhältnisse im Medium reagierten. Auch hier zeigen sich Beziehungen zur natürlichen Umwelt.

Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor, der für Gefrierschutzuntersuchungen von großer Bedeutung sein kann, ist die Temperatur des umgebenden Mediums, deren niedrige Werte letztlich auch die natürliche Frosthärte verursachen. Diese jahreszeitliche Abhängigkeit ließ sich bei Farnen nachweisen. Während ein aus dem Kaltgewächshaus im Januar mit 20 % Glycerin geschütztes Farnblatt ohne Gefrierschäden eingefroren werden konnte, wurden Stücke von Farnblättern, die aus dem Warmgewächshaus stammten, selbst nach Glycerinbehandlung durch intrazelluläre Eisbildung völlig zerstört. Diese jahreszeitliche Abhängigkeit wurde auch von anderen Autoren, so von LEVITT ( 1966 ) bei Pflanzen, sowie von THEEDE ( 1967 ) bei Meeresmuscheln beschrieben.

Bei der natürlichen Frosthärte soll das freie Wasser in der Zelle gebunden werden. Das bedeutet eine Hydratisierung cytoplasmatischer Strukturen und eine Erhöhung des Gehaltes der löslichen Substanzen , z.B. Saccharose ( TERUMOTO, 1958 ; SAKAI, 1960 ) . Letztlich findet also eine Erhöhung des osmotischen Wertes des Zellinhaltes statt. Damit verbunden ist eine Gefrierpunktserniedrigung und eine größere Unterkühlbarkeit. Dadurch ist das Intervall, in dem sich Eiskristalle bilden können, eingeschränkt und die Chance, die Zellen durch rasches Einfrieren im latent lebenden Zustand zu erhalten, erhöht.

Als dritter wichtiger innerer Faktor, der für den Gefrierschutz der Zellen von Bedeutung sein kann, ist der physiologische Zustand zu erwähnen. Dauerzellen von Saccharomyces mit hohem Glycogengehalt waren wesentlich frostresistenter als vegetative Zellen ( MOOR 1964). Hohe Frostresistenz weisen auch Sporen und Samen mit geringem Wassergehalt auf ( LEVITT 1966). Doch scheinen diese Formen der physiologischen Ruhe für die Gefrierätzmethode wenig geeignet, da durch den geringen Anteil an sublimierbarem Wasser kaum eine Ätztiefe zu erzielen ist. Diese drei natürlichen Faktoren, die osmotische Toleranz, die natürliche Frosthärte und der physiologische Zustand der Zellen sind offenbar mitentscheidend für den Gefrierschutz von Geweben und Zellen. Deshalb sollte bei Untersuchungen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens jeder Organismus zuerst auf diese drei natürlichen Faktoren hin geprüft werden.

In der Regel wird jedoch ein Objekt vorgegeben sein, das meist keinen der oben erwähnten natürlichen Faktoren aufweisen wird. Die einzige Möglichkeit, dann einen Gefrierschutz zu erreichen, ist der Zusatz von Frostschutzmitteln. Im Prinzip wird hiermit nichts anderes versucht, als die natürlichen Faktoren auf künstlichem Wege zu imitieren. Als Kriterien für die Verwendbarkeit eines Gefrierschutzmittels gelten seine Fähigkeit zur Frostschutzvermittlung und eine mögliche Toxizität.

Zunächst sollte die natürliche Frosthärte imitiert werden, indem den untersuchten Zellen und Geweben Saccharose im Medium angeboten wurde. Von den pflanzlichen Gewebekulturen wurden die applizierten Zuckerlösungen absorbiert ( ob als Saccharose oder vorher zerlegt zu Glucose, wurde nicht untersucht). Es scheint jedoch, im Gegensatz zur Auffassung von MOOR (1964), daß Gewebe von Dikotylen in der Lage sind, Saccharose direkt ohne vorherige Hydrolyse aufzunehmen ( GÖRING, 1966). Ein ausreichender Gefrierschutz des Cytoplasmas wurde durch die Zuckerinkubation jedoch nicht erreicht.

Die Anwendbarkeit anderer Gefrierschutzmittel wird stark durch ihre Toxizität eingeschränkt, die besonders im Falle des Äthylenglycol zutage tritt. Daher erschien dieses Gefrierschutzmittel für unsere Objekte ungeeignet. Das DMSO scheint in Konzentrationen bis 15 % von den Zellen toleriert zu werden, verlieh den untersuchten Gewebekulturen und Dinoflagellaten jedoch keinen ausreichenden Gefrierschutz. Auch die Verwendung des bewährten Gefrierschutzmittels Glycerin war für die Dinoflagellaten der ersten Gruppe, wie schon erwähnt , nicht möglich, da die beiden Arten eine geringe osmotische Toleranz aufwiesen.

Anders dagegen verhielt sich Oxyrrhis ; denn dieser Flagellat war auf Grund hoher osmotischer Toleranz in der Lage, 20 % Glycerin im Meerwasser zu ertragen. Diese Glycerinkonzentration ergab auch einen ausreichenden Gefrierschutz.

Komplizierter liegen die Verhältnisse bei höheren Pflanzen, da die Aufnahme des Glycerins offenbar vom Differenzierungsgrad des Gewebes abhängig ist. So zeigten BRANTON und MOOR ( 1964 ), daß Zwiebelwurzelspitzen in 20 % Glycerin plasmolysierten. Erst wenn die Wurzeln sich direkt in 20 % Glycerin von Beginn an entwickeln, wird bei geringer Wachstumseinschränkung offenbar dieses Gefrierschutzmittel aufgenommen. Dies ließ sich in den von uns untersuchten pflanzlichen Gewebekulturen direkt nachweisen ; denn mehrmals angebotenes Glycerin wurde von den Geweben bei kaum erkennbarer Wachstumsbeschränkung aufgenommen. Die Gewebekulturen stellen demnach für Gefrierschutzuntersuchungen ein ausgezeichnetes Objekt dar, weil die Aufnahme des Glycerins unmittelbar kontrolliert werden kann. Ebenso läßt sich eine eventuelle Toxizität des Gefrierschutzmittels direkt am Wachstum der Gewebe nachweisen. Es ist anzunehmen, daß das Glycerin, ähnlich wie bei den Wurzelinitialen der Zwiebel ( BRANTON und MOOR 1964) , von den meristematischen Geweben primär aufgenommen wird. Danach gelangt das Gefrierschutzmittel durch Teilung der meristematischen Zellen schließlich in die parenchymatischen Zellen, die den Hauptteil der Kalluskultur ausmachen. Dadurch werden diese oft hoch vakuolisierten Zellen ebenfalls mit einem ausreichenden Gefrierschutz versehen. Diese Vermittlung der meristematischen Gewebe scheint für den Schutz solcher differenzierter Gewebe unumgänglich zu sein ; denn Blattgewebe von Daucus z.B. konnte durch 20 % Glycerin nicht ausreichend geschützt werden. Es ist anzunehmen, daß dies darauf beruht, daß das Glycerin von den differenzierten Blattgeweben nicht aufgenommen wird. Somit scheint ein Schutz ausdifferenzierter Gewebe nur über den Umweg der meristematischen Zellen möglich. Da sich in geeigneten pflanzlichen Gewebekulturen ( Karotten ) eine Morphogenese induzieren läßt, d.h. eine Entwicklung bis zu blühfähigen Pflanzen möglich ist (STEWARD et al. 1964 ) , erscheint ein Frostschutz sämtlicher Pflanzenorgane durch Vermittlung meristematischer Gewebekulturzellen durchaus denkbar.

Durch zwei Faktoren ließ sich der mit 20 % Glycerin erzielte Gefrierschutz noch verbessern. Das war zunächst der Zusatz von Kokosnußmilch zu Glycerin. Der Effekt der Kokosnußmilch könnte auf einer Stimulierung des Wachstums der Gewebe, die dann rascher das Glycerin aufzunehmen vermögen, beruhen. Darüber hinaus könnte die Wirkung der Kokosnußmilch auch auf ihren Aminosäurenbestandteil zurückgeführt werden, der die osmotische Resistenz der Zellen erhöhen kann. Nach WILDING et al. ( 1960 ) soll die natürliche Frosthärte mit dem verstärkten Auftreten von Aminosäuren in der Zelle gekoppelt sein.

Der zweite Faktor, durch den sich eine Verbesserung des Gefrierschutzes erzielen ließ, war eine Temperaturerniedrigung auf $2^{o}$ - $4^{o}$ C. Diese relativ niedrige Temperatur, bei der das Gefrierschutzmittel angeboten wurde, war besonders für den Frostschutz menschlicher Gewebekulturzellen ( FL-Zellen ) Voraussetzung. Der Effekt der niedrigen Temperaturen läßt sich vielleicht damit erklären, daß die Permeabilitätsbarriere der Membranen herabgesetzt wird und das Gefrierschutzmittel rasch in die Gewebe eindringen kann (vergl.WHITEFIELD +MURRAY 1956). Nach RING (1965) soll der Lipidanteil der Membranen bei diesen niedrigen Temperaturen verändert sein.

Systematische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Glycerins, die dem Gefrierschutz zugrunde liegt, fehlen, und so wird ganz allgemein angenommen, daß das Glycerin durch Hydratation freies Wasser in den Zellen bindet. Weiterhin wird eine gewisse Pufferwirkung gegen pH-Verschiebungen und ein ausgleichender Einfluß gegenüber hohen Salzkonzentrationen, die beim Einfrieren auftreten können, postuliert ( MOOR 1964 ). Da eingehende Untersuchungen über die Wirkungsweise des Glycerins als Frostschutzmittel fehlen, vermuten wir , analog zu der natürlichen Frosthärte, eine Konzentrierung des Zellsaftes. Damit wird das Intervall zwischen Gefrierpunkt und Rekristallisationspunkt, in dem sich allein Eiskristalle bilden, eingeschränkt und eine Vitrifikation der Gewebe ermöglicht.

Die Anwendung des Glycerins als Gefrierschutzmittel stößt bei Zellen mit geringer osmotischer Toleranz auf große Schwierigkeiten, da schützende Konzentrationen des Glycerins jenseits der osmotischen Toleranzgrenze liegen. Bei diesen Zellen führte die Anwendung von kombinierten Gefrierschutzmitteln zum Erfolg. Das von VOS und KAALEN ( 1965) für den Gefrierschutz von tierischen Gewebekulturen eingeführte polymere Frostschutzmittel PVP, kombiniert mit Kälberserum und niedrigen Glycerin - konzentrationen , lag nach den kryoskopischen Messungen unterhalb der osmotischen Toleranzgrenze und verlieh den Dinoflagellaten und FL-Zellen einen ausreichenden Gefrierschutz. Der schützende Effekt dieses kom - plexen Gefrierschutzmittels setzt sich wahrscheinlich aus der Summe der Schutzwirkungen seiner Einzelkomponenten zusammen. Besonders wichtig erscheint der polymere Anteil, der die ja als Einzelzellen vorliegenden Dinoflagellaten und FL-Zellen allseitig umgeben kann. Die Frostschutzwirkung der Polymere wird von NASH (1962) ganz allgemein als das Verhindern der Denaturierung von Membranen interpretiert. Auffälligerweise entfaltete dieses komplexe Gefrierschutzmittel keine Frostschutzwirkung bei den kompakten pflanzlichen Gewebekulturen, da hier offenbar das polymere Schutzmittel allein die an der Peripherie liegenden Zellen umhüllen und schützen kann, während die im Inneren des Gewebeblöckchens liegenden Zellen nicht erreicht werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nach den vorliegenden Untersuchungen der Gefrierschutz der Organismen von folgenden Faktoren abhängt:

1. natürliche Umweltbedingungen
   a. primär osmotische Toleranz der Zellen
   b. primäre Wachstumstemperatur der Zellen
2. physiologischer Zustand der Zellen
3. Differenzierungsgrad der Gewebe
4. Vorliegen der Organismen als Einzelzelle oder als Gewebe

## Zur vergleichenden Untersuchung der Membranstrukturen verschiedener Organismen mit Hilfe der Gefrierätztechnik

### Zum Artefaktproblem bei elektronenmikroskopischer Präparation

Bevor im Anschluß an die Gefrierschutzuntersuchungen die Ergebnisse des Gefrierätzverfahrens diskutiert werden, soll zunächst eine kritische Betrachtung elektronenmikroskopischer Präparationsverfahren erfolgen, weil die Kenntnis möglicher Fehler - und Artefaktquellen für die Deutung der Bilder von größter Bedeutung ist.

Bei der Dünnschnitt- Technik ist die Artefaktgefahr besonders groß, weil das Gewebe nicht nur fixiert, sondern auch meist durch Alkohol entwässert wird. Dabei tritt eine Veränderung zumindest eines Teils der Lipide durch Extraktion auf. Außerdem kann es in dem nächsten Präparationsschritt, der Einbettung, durch Polymerisierung zu Volumenänderungen in der Zelle kommen ( MÜHLETHALER et al., 1965 ; GIESBRECHT und DREWS, 1966).

Auch im Elektronenmikroskop muß noch mit Veränderungen der biologischen Strukturen gerechnet werden, da durch Elektronenbeschuß der größte Teil der leichten Atome herausgeschossen wird und im wesentlichen nur ein Kohlenstoffgerüst übrigbleibt ( neben den zur Fixierung und Kontrastierung verwandten Metallatomen). Weiterhin ist bis heute nicht restlos geklärt, welche Teile der Membran von den Metallatomen kontrastiert werden und ob von Permanganat und Osmium die gleichen oder unterschiedliche Membranschichten dargestellt werden.

Ebenso sollten periodische Strukturen, die unterhalb der kleinstmöglichen Schnittdicke von 200 Å liegen, mit großer Vorsicht beurteilt werden, da übereinanderliegende Schichten einen falschen Membranbau vortäuschen könnten.

Ebenso sind bei der Negativkontrastierung sowie Bedampfung isolierter Tylakoide artifizielle Veränderungen nicht auszuschließen, da die Thylakoide auf Folien zunächst antrocknen.

So wiesen MENKE und WEICHAN ( 1968 ) an isolierten Thylakoiden von Rhodopseudomonas spheroides nach, daß beim Antrocknen die Lipide herauslaufen und somit eine Entmischung der Thylakoidmembran stattfindet.

Besonders wichtig erscheint bei diesem Verfahren auch die Tatsache, daß die biologischen Strukturen nicht mehr dem Elektronenbeschuß ausgesetzt werden müssen, da ja nur die Platin-Kohle-Abdrucke im Elektronenmikroskop untersucht werden.

Dennoch müssen auch hier die Ergebnisse, die mit Hilfe dieser modernen Präparationstechnik erhalten wurden, hinsichtlich artifizieller Veränderungen eingehend geprüft werden.

Es wäre z.B. denkbar, daß das verwendete Gefrierschutzmittel den physiologischen Zustand der untersuchten Zellen verändert. Zur Kontrolle dieser Beeinflussung wurde die Beweglichkeit der Dinoflagellaten und Euglenen benutzt, da diese Organismen empfindlich auf physiologische Veränderungen im Medium mit Unbeweglichkeit reagierten. Wenn also bewegliche Zellen eingefroren wurden, konnte diese Artefakt-Gefahr umgangen werden.

Auch bei den pflanzlichen Gewebekulturen sind ultrastrukturelle Veränderungen auf Grund von Einwirkung des Gefrierschutzmittels wenig wahrscheinlich, weil die Gewebe bei den verwendeten Gefrierschutzmitteln trotz Aufnahme der Lösungen- wenn überhaupt- nur eine sehr geringe Beeinträchtigung des Wachstums zeigten.

Bei dem nächsten präparativen Schritt, dem Einfrieren, kann das Objekt durch Eiskristallbildung geschädigt werden. Doch ist eine Kontrolle dieser Artefaktquelle im Elektronenmikroskop möglich, da Zerstörungen der Zellstrukturen durch Eiskristallbildung verhältnismäßig leicht erkannt werden können. Vor allem in pflanzlichen Zellen muß die Zerstörung der Vakuolenmembran (Tonoplast) , die durch wachsende Eiskristalle aus der wässrigen Phase des Vakuolenraums erfolgt, als sicheres Indiz für eine irreversible Schädigung des Organismus angesehen werden. Nach Beobachtungen von MOOR (1964) soll der freiwerdende Vakuoleninhalt stets zum Tod von Hefezellen führen.

Die Größe der sich bildenden Eiskristalle allein ist nicht geeignet als Gradmesser für das Eintreten des Zelltodes, da offenbar auch das verwendete Gefrierschutzmittel die Form und Größe der Kristalle beeinflußt. So schien nach Applikation von Glycerin im Gegensatz zu DMSO das eingefrorene Material feinkristalliner zu sein. Dieser Effekt des Glycerins soll nach GIESBRECHT (1968) auf eine Art von "Verschmierung" der Zellstrukturen zurückzuführen sein. Hierdurch können Makromoleküle, wie z.B. die DNS von Bakterien, maskiert werden.

Eine weitere Fehlerquelle bei der Deutung von Gefrierätzbildern könnte die von GIESBRECHT (1968) an Bakterien beschriebene plastische Verformung von halbfesten Zellanteilen sein, die selbst bei Ätztemperaturen von -100° C noch nicht vitrifiziert werden. Die durch das Mikrotommesser herausgezogenen halbfesten Anteile bilden Hörner mit hochgeordneten Molekülketten, die Anlaß zu Fehldeutungen geben könnten. Erst bei dem Vergleich mit gefriergeätzten Latexkugeln, die in den Ätzpräparaten ähnliche hochgeordnete Hörner zeigten, wurde klar, daß der hohe Ordnungsgrad der Hörner erst sekundär durch das Herausziehen der halbfesten Anteile mit Hilfe des Mikrotom-Messers verursacht wurde. In den von uns untersuchten Organismen ließen sich jedoch ähnlich plastisch verformbare Zellbestandteile nicht nachweisen.

Ebenso könnte das von MOOR ( 1967a ) an Grenzflächen des aufgebrochenen Materials beschriebene schichtförmige Eutektikum eine Fehlinterpretation verursachen ( vergl. BRANTON und PARK, 1967). Hierauf wird an anderer Stelle noch ausführlicher eingegangen.

Ein besonderes Deutungsproblem könnten auch die in den Replicas oft zu beobachtenden mehr oder weniger großen Bedampfungspartikel darstellen, die im Medium, das die Zelle umgibt, auftreten. Deshalb wäre der Einwand denkbar, daß es sich bei den auf Thylakoidmembranen nachgewiesenen Partikeln auch um solche Bedanpfungskörner handelt. Auf verschiedenen Oberflächen der Thylakoidmembran von unterschiedlichen Organismen waren jedoch regelmäßig zwei Typen von Partikeln nachzuweisen, deren Durchmesser im Gegensatz zum Bedampfungskorn relativ konstant war. Zudem ließ sich feststellen, daß die Partikel auf den Thylakoidmembranen hohl sind. Beide Faktoren sprechen dagegen, daß diese Partikel ausschließlich Dekorationsartefakte darstellen.

Selbst wenn man annimmt, daß die Partikel auf den Thylakoidmembranen bedampfte Eiskristalle darstellen, die aus Wasseransammlungen zwischen den Membranen beim Herunterfrieren entstehen könnten, spricht doch die stete Wiederkehr der beiden Partikeltypen für eine unterschiedliche Strukturierung des Untergrundes. Die angenommenen Eiskristalle würden also verschiedene Funktionsstrukturen von Außen- und Innenseite der Thylakoidmembran verdeutlichen. Daß es sich bei den Membranpartikeln nicht um reine Artefakte handeln kann, zeigen auch die Chloroplasten gebleichter Chlorellazellen, bei denen die Partikel auf den Thylakoidmembranen völlig verschwunden sind.

Eine falsche Beurteilung der Replicas im Elektronenmikroskop kann auch durch Gewebereste verursacht werden, die mit Hilfe von Eau de Javelle und Chromsäure nicht restlos von dem Pt/C-Abdruck herausgelöst wurden. In der Regel sind solche Zell- oder Gewebereste aber verhältnismäßig leicht im Elektronenmikroskop von dem reinen Abdruck zu unterscheiden.

Aus der Aufzählung der Artefaktquellen, die zu Fehlinterpretationen der Zellstrukturen führen könnten, wird ersichtlich, daß die Replicas zwar mit Vorsicht beurteilt werden müssen, doch erscheint bei Kenntnis und nach Abschätzung aller möglichen Fehlerquellen, vor allem nach Vergleich mit anderen elektronenmikroskopischen Präparationsverfahren die Methode der Gefrierätzung als eine außerordentlich wichtige Technik, mit deren Hilfe zum ersten Mal ein weitgehend getreues Abbild der Ultrastruktur von latent lebenden Zellen erhalten werden kann.

## Zum Bau des photosynthetischen Apparates

### Zur Anordnung des Thylakoidsystems in der Zelle

Von besonderem Interesse scheint die Frage, ob innerhalb der bisher untersuchten Organismen ein gewisser zunehmender Ordnungszustand des Thylakoidsystems festzustellen ist.

Offenbar läßt sich dieser zunehmende Ordnungszustand schon in einem einzigen Verwandschaftskreis beobachten.

So können bei phototrophen Bakterien Formen mit im gesamten Cytoplasma verteilten bläschenartigen Thylakoiden ( Rhodopseudomonas spheroides oder Rhodospirillum rubrum ) von solchen Formen unterschieden werden, bei denen die blattartig abgeflachten Thylakoide zu Stapeln zusammentreten wie bei Rhodospirillum molischianum ( vergl. die Übersichten von DREWS und GIESBRECHT, 1966, sowie von COHEN-BAZIRE und SISTROM, 1966).

Den höchsten Ordnungszustand der Thylakoide innerhalb der Bakteriengruppe zeigt offenbar Rhodopseudomonas viridis, denn bei diesem Organismus sind die Thylakoide in einem hochgeordneten Stapel vereinigt ( GIESBRECHT und DREWS , 1966 ) .

Ähnliche Verhältnisse scheinen bei Rhodopseudomonas palustris vorzuliegen ( COHEN-BAZIRE und SISTROM, 1966).

Unterschiedliche Ordnungszustände der Thylakoiden können auch innerhalb der Cyanophyceen beobachtet werden ; denn auch hier gibt es Arten mit im Cytoplasma verteilten Bläschen neben Arten, bei denen die Thylakoide zu mehreren gestapelt sind ( RIS und SINGH, 1961 ; JOST, 1965).

Allen Prokaryonten gemeinsam ist jedoch das Fehlen einer Hüllmembran, die den photosynthetischen Apparat vom Cytoplasma abgrenzt.

Bei allen höher entwickelten phototrophen Organismen ist der photosynthetische Apparat in einem besonderen Organell mit doppelter Hüllmembran organisiert. Innerhalb der Gruppe der Algen nehmen die Rhodophyceen hinsichtlich des Baues ihres Chromatophors eine relativ ursprüngliche Stellung ein, da die Thylakoide meist individuell in der Matrix verteilt sind ( GANTT und CONTI, 1965 ; BISALPUTRA und BISALPUTRA, 1967). Doch läßt sich manchmal schon eine gewisse Parallelorientierung erkennen.

Auch bei den von uns untersuchten Dinoflagellaten sind die Thylakoide stets dicht nebeneinander parallel angeordnet. Eine Stapelbildung ließ sich jedoch nicht beobachten. Dagegen konnte bei Euglenen und höher entwickelten Algen eine beginnende Stapelbildung festgestellt werden.

Es kann daher angenommen werden, daß der Chromatophor der Dinoflagellaten eine relativ ursprüngliche Form darstellt und Ähnlichkeit mit dem der Rhodophyceen hat.

Ein bedeutender morphologischer Unterschied zu allen bisher beschriebenen Chromatophoren oder Chloroplasten ist jedoch die Existenz eines oder zwei stielartiger Fortsätze. Es kann vermutet werden, daß der Chromatophor durch diesen Fortsatz mit der Zellperipherie verbunden ist. Mit welchem Zellanteil der Chromatophor an der Zellperipherie verbunden ist, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Die Lösung dieser Frage erscheint uns aber im Hinblick auf die Zwischenstellung der Dinoflagellaten zwischen Prokaryonten und Eukaryonten ( vergl. DODGE, 1965 ; GIESBRECHT, 1966) besonders wichtig zu sein ; denn von Prokaryonten ist bekannt, daß sich dort das Thylakoid-System aus der Cytoplasmamembran entwickelt ( GIESBRECHT und DREWS, 1962).

Auch bei Euglena kann der parallele Verlauf der Thylakoide innerhalb eines Chloroplasten von einem Ende zum anderen verfolgt werden. Jedoch sind im Unterschied zu den Dinoflagellaten häufig 3 - 5 Thylakoide zu einem lang durchlaufenden Stapel vereinigt.

Ein im Prinzip ähnlicher Bau der Chloroplasten konnte auch bei Chlorella beobachtet werden. Oft ließ sich das Wechseln der Thylakoide von einem Stapel zum anderen verfolgen, so daß innerhalb eines Chloroplasten dickere und dünnere Stapel resultieren. Es scheint deshalb etwas zu schematisch, aus der Zahl der Thylakoide pro Stapel eine phylogenetische Gesetzmäßigkeit abzuleiten, wie es GIBBS ( 1962) versucht hat.

Wenn man sich schon auf phylogenetische Spekulationen einlassen will, dann könnte eher ein anderes Merkmal als Indiz einer phylogenetischen Entwicklung gewertet werden : der Übergang zur Granabildung. Die durch den gesamten Chromatophor parallel verlaufenden Thylakoide der Dinoflagellaten können in der Entwicklung des Organells als ursprünglich angesehen werden. Der nächste progressive Schritt könnte die Vereinigung der Thylakoide zu durchlaufenden Stapeln sein ( Euglena ). Danach ließe sich als phylogenetisch bedeutsame Weiterentwicklung die Vereinigung der Thylakoide zu sogenannten Pseudograna und Grana vermuten. In Übereinstimmung mit MURAKAMI et al. (1965) können die bei Chlorella auftretenden gestapelten Thylakoide als granaähnlich bezeichnet werden, da im Unterschied zu echten Grana die Thylakoide der Stapel durch den gesamten Chloroplasten verlaufen. Echte Grana treten offensichtlich auch schon innerhalb der Algen auf, und zwar in der Ordnung Conjugales ( KAJA, 1966 ). Auch bei Armleuchteralgen ( Nitella ) wurden offenbar echte Grana beobachtet ( MENKE, 1966) . Innerhalb der Klasse der Algen läßt sich also eine Entwicklung zur Granabildung verfolgen. In höher entwickelten Pflanzen kommen nach bisherigen Untersuchungen in ausentwickelten Chloroplasten allein die echten Grana vor.

In den Grana von Karottenchloroplasten betrug die Dicke der Thylakoide etwa 300 Å. Dieser Wert stimmt annähernd überein mit den von MÜHLETHALER et al. (1965) für Spinacea und von JOST ( 1965 ) für die Blaualge Oscillatoria angegebenen Abmessungen. Dagegen gaben GIESBRECHT und DREWS ( 1966 ) für Rhodopseudomonas viridis sowie BRANTON und PARK ( 1967 ) für Pharbitis und Spinacia Thylakoiddicken um 200 Å an. Diese mit Hilfe derselben Technik ( Gefrierätzung ) ermittelten Werte weichen also recht erheblich voneinander ab.

Die mit Hilfe der Gefrierätztechnik erzielten Werte können aber nicht direkt mit Dünnschnittbefunden verglichen werden, da durch Fixierung und Einbettung offenbar artifizielle Veränderungen der Thylakoidmembran erfolgen können. So wurde in Dünnschnitten von Daucus-Chloroplasten die Dicke des Thylakoids mit durchschnittlich 200 Å gemessen. Wenn man zugrunde legt, daß die Gefrierätzbefunde weitgehend den natürlichen Verhältnissen entsprechen, muß gefolgert werden, daß das Thylakoid von fixierten und eingebetteten Chloroplasten um etwa ein Drittel geschrumpft ist. Nach MÜHLETHALER et al. (1965 ) soll dies nicht allein auf ein einfaches Schrumpfen zurückgeführt werden können. Vielmehr nahmen diese Autoren an, daß beim Fixieren die Proteinpartikel entknäuelt werden und dann beidseitig von der Lipidschicht einen dünnen durchgehenden Film ausbilden. Auch von GIESBRECHT und DREWS ( 1966 ) wurden erhebliche Schrumpfungsartefakte in fixierten und eingebetteten Bakterien beschrieben.

Nach diesen Befunden müssen frühere Thylakoidmessungen auf der Grundlage von Dünnschnitten mit großer Vorsicht beurteilt werden.

Nachdem eine gewisse Entwicklung in der Anordnung der Thylakoide innerhalb der verschiedenen Prokaryonten und von dort bis hin zu den höheren Pflanzen abgeleitet werden kann, erschien die Frage besonders interessant, ob auch auf makromolekularem Niveau ähnliche Entwicklungen zu verfolgen sind.

Zum makromolekularen Bau der Thylakoidmembran

Bei den Untersuchungen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens wurde der partikuläre Bau der Thylakoidmembran sämtlicher von uns untersuchter Organismen deutlich.

Bei Dinoflagellaten waren angebrochene Oberflächen von Thylakoidmembranen sehr selten zu beobachten. Die auf einigen freigelegten Flächen identifizierten Partikel gehörten alle zu einem Typ von 110 Å. Möglicherweise kann dieser Typ von Partikeln mit dem in höher entwickelten Organismen identifizierten kleinen Typ homologisiert werden. Da aber große Teile der Membran, auf der die 110 Å Partikel in Dinoflagellaten nachgewiesen wurden, ohne Partikelbesatz waren, ist nicht sicher, ob hier tatsächlich gleichartige Strukturen vorliegen.

Ähnlich den Dinoflagellaten waren auch bei Euglena Thylakoidoberflächen nicht häufig angebrochen. In einigen kleinen tangential getroffenen Flächen waren jedoch zwei Typen von Partikeln voneinander zu unterscheiden. Auch schien die Verteilung der beiden Partikeltypen auf den Oberflächen ähnlich wie auf den von höher entwickelten pflanzlichen Organismen. Das Auftreten dieser beiden Partikeltypen auf zwei verschiedenen Membranflächen der Thylakoide steht in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren ( MÜHLETHALER et al., 1965 ; JOST, 1965 ; STAEHELIN, 1966).

Auch in sämtlichen anderen von uns untersuchten Organismen, der Grünalge Chlorella, dem Lebermoos Marchantia, dem Farn Asplenium und der Samenpflanze Daucus waren die beiden Partikeltypen in der schon beschriebenen typischen Verteilung auf den Oberflächen der Thylakoide anzutreffen. Es kann somit kaum Zweifel über die Existenz der beiden Partikeltypen geben. Jedoch besteht Unklarheit darüber, welchen Flächen des Thylakoids die Partikel zugeordnet werden können.

Hierbei ist das zentrale Problem, ob die Brüche entlang der Grenze zwischen Membran und anderer Phase verlaufen oder ob Brüche in die Membran hinein erfolgen. Diese Frage gilt für die Deutung des Baues aller Membranen ganz allgemein.

Einen Verlauf der Brüche entlang der Membrangrenzen wurde von einer Züricher Arbeitsgruppe angenommen (MÜHLETHALER et al., 1965 ; JOST 1965 ; MOOR, 1967), während nach Auffassung amerikanischer Autoren ( BRANTON, 1966 ; BRANTON und PARK, 1967) die Brüche in die Membran hinein erfolgen sollen. Nach Meinung der amerikanischen Autoren muß die an der Basis tangential gebrochener Flächen erkennbare Bruchkant als der Teil der Membran angesehen werden, der durch den Bruchprozeß wegsplittert. Demnach wird dann das partikuläre Innere der Thylakoidmembran sichtbar.

Nach MOOR (1967a) kann sich jedoch an den Grenzflächen der aufgebrochenen Membran ein schichtförmiges Eutektikum ausbilden, das eine halbe unit-membrane vortäuscht.

Weiterhin führte die Untersuchung synthetischer bimolekularer Lipid-Proteinschichten mit Hilfe der Gefrierätzung zu einer Stützung der Züriche Auffassung, denn in Ätzbildern konnten nur warzige Oberflächen beobachtet werden ( MOOR, 1967b). Diese warzige Oberfläche kann nur den Proteinen zugerechnet werden, da Lipide nach Gefrierätzung stets glatte Flächen ergeben. Weil die Proteine in diesen bimolekularen Schichten immer die Außenseite einnehmen (STOECKENIUS ,1967), stellt sich also in der warzigen Fläche die Oberfläche der Membran dar.

Auch auf Grund eines Analogieschlusses scheint die Ansicht von MOOR (1967b) wahrscheinlicher. In Mitochondrien von Chlorella ließen sich mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens innere partikuläre Membranen darstellen.

Da nach Negativkontrastierung wahrscheinlich identische Partikel auf den Oberflächen der Christae nachgewiesen werden konnten ( FERNANDEZ-MORAN et al., 1964 ), liegt es nahe anzunehmen, daß auch bei der Gefrierätzung die Partikel den Oberflächen der inneren Mitochondrienmembranen zugeordnet werden müssen. Wenn man weiterhin die Annahme von BRANTON ( 1966 ) zugrunde legt, daß die Brüche in allen Membranen gleichartig verlaufen, kann von den inneren Mitochondrienmembranen auf die Thylakoidmembranen geschlossen werden. Mithin müssen die in Plastiden nachgewiesenen Partikel auf den Oberflächen der Thylakoide lokalisiert sein.

Das Problem, welchen Flächen des Thylakoids die Partikel zugeordnet werden müssen, soll bei Erörterung der möglichen Partikelfunktion diskutiert werden.

Da die Brüche vorwiegend entlang der Membrangrenzen verlaufen, werden große Flächen freigelegt, die erstmalig quantitative Aussagen über die Verteilung der Partikel auf den Thylakoidmembranen ermöglichen. Sowohl die Größe als auch die Verteilung der Partikel auf den Oberflächen der Thylakoidmembran von verschiedenen Organismen wurden in Tabelle V gegenübergestellt. Dabei ist zu ersehen, daß in der Größe und Verteilung der Partikel auf den Thylakoidflächen bei Organismen verschiedener systematischer Kategorie offenbar eine weitgehende Übereinstimmung besteht. Unterschiede zwischen den verschiedenen systematischen Kategorien in Größe und Besatz der Partikel lassen sich also nicht rekonstruieren.

Tabelle V. Größe und Verteilung der Partikel auf den Membranoberflächen der Thylakoide

| Objekt | mittlerer Durchmesser der Partikel in Å | | Anzahl der Partikel auf $0,1\,\mu^2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | große | kleine | große | kleine |
| Dinoflagellaten | ? | 11o | ? | ? |
| Euglena | 18o | 9o | 6 | 33 |
| Chlorella | 16o | 9o | 1o | 25 |
| Marchantia | 15o | 9o | 9 | 35 |
| Asplenium | 17o | 9o | 1o | 38 |
| Daucus | 16o | 9o | 9 | 37 |

Da auch von JOST ( 1965 ) mit Hilfe der Gefrierätztechnik bei Thylakoiden der Blaualge Oscillatoria zwei Partikeltypen in ähnlichen Dimensionen identifiziert wurden, liegt es nahe, auch die Cyanophyceen in das einheitliche Bild der Thylakoidmembran, die aus einer Trägermembran mit daraufsitzenden Partikeln besteht, mit einzubeziehen.

Ein wesentlich anderer Bau der Thylakoide muß für grüne Bakterien angenommen werden ; denn von GIESBRECHT und DREWS (1966) wurde nur ein Typ von Partikeln beschrieben. Zudem konnten allein in diesen grünen Bakterien hexagonale Gitterstrukturen in der Thylakoidmembran nachgewiesen werden, während in höher entwickelten Pflanzen mit Hilfe verschiedener Untersuchungstechniken tetragonale Flächengitter identifiziert wurden (PARK und BIGGINS, 1964 ; HOSEMANN und KREUTZ , 1966).

Somit scheinen die Bakterien eine andere makromolekulare Architektur der Thylakoidmembran zu besitzen als alle anderen bisher untersuchten Organismen.

Solche strukturellen Unterschiede im Bau der Thylakoidmembran von Bakterien und höheren Organismen sind durchaus erklärlich, da die Bakterien sich in mancher Beziehung von höheren Organismen unterscheiden.

So sollen bei Rhodospirillum rubrum oxydative-und Photophosphorylierung an die gleichen Strukturen gebunden sein (GELLER, 1962), während bei höheren Organismen beide Systeme getrennt in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert sind.

Weiterhin scheint von Bedeutung, daß photosynthetisch aktive Bakterien keinen Sauerstoff entwickeln, da ihnen die Hill-Reaktion fehlt. Statt des Wassers werden primär entweder organische Säuren oder anorganische Schwefelverbindungen oxydiert.

Außerdem fehlt phototrophen Bakterien das Pigmentsystem II, das für alle höher entwickelten Organismen mit seinem Gehalt an Chlorophyll b charakteristisch ist. Das bei Bakterien auftretende Pigmentsystem kann in mancher Beziehung mit dem Pigmentsystem I der höheren Pflanzen homologisiert werden. Jedoch enthält das Pigmentsystem der Bakterien statt des Plastochinons Ubichinon und reduziert NAD statt NADP ( vergl. VERNON und KE, 1966).

Es ist daher durchaus denkbar, daß all diese Unterschiede in dem photosynthetischen Apparat von Bakterien und höheren Pflanzen sich auch in der makromolekularen Architektur der Thylakoidmembran widerspiegeln.

Zur Frage des Quantasoms als photosynthetische Einheit

Mit dem makromolekularen Aufbau eng verknüpft ist die Frage nach der Funktion der auf den Thylakoidoberflächen nachweisbaren Partikel. Unter dem einen Typ von Partikeln, von SAUER und CALVIN (1962) als Quantasomen bezeichnet, wurde eine multifunktionelle Struktur verstanden, die sowohl aus Proteinen als auch aus Chlorophyll und Karotinoiden bestehen sollte. Von ODA und HUZISIGE (1965) wurde das dahingehend präzisiert, daß in den Quantasomen die Enzyme der Photophosphorylierung

und der Elektronenübertragung lokalisiert sein sollen. Während MÜHLETHALER et al. ( 1965 ) die von ihnen mit Hilfe der Gefrierätzung identifizierten großen Partikel ganz allgemein als Multienzym-Komplexe kennzeichneten, wurden sie von PARK und PON ( 1963 ) als Ort der Photoreduktion angesehen. Im Gegensatz dazu konnten HOWELL und MOUDRIANAKIS ( 1967 ) nachweisen, daß nach Entfernen der Partikel von den Thylakoidmembranen noch eine volle Hill-Reaktion festzustellen ist. Nach diesen Autoren ist der Ort der Hill-Reaktion delokalisiert auf der gesamten Membran. In der EDTA-Fraktion, in der sich die Partikel, die von den Membranen abgelöst wurden, befanden, ließ sich ein nicht chlorophyllöses Protein nachweisen. Bezeichnenderweise wurden die Proteinpartikel, die auf den Thylakoidmembranen saßen, als Strukturproteid bezeichnet. Es wurde also angenommen, daß keine Lipidkomponenten am Aufbau der Partikel beteiligt sind.

Zunächst scheinen die Untersuchungen über die Bleichung von Chlorellazellen dieser Auffassung zu widersprechen, denn der makroskopisch beobachtbare Pigmentschwund war offenbar mit dem elektronenmikroskopisch nachweisbaren Partikelschwund auf den Membranen korreliert. Somit könnte man also annehmen, daß die Chlorophyllmoleküle in den Partikeln lokalisiert sind.

Andererseits muß aber auch berücksichtigt werden, daß bei der Desorganisation des Chloroplasten, die eine Folge des Bleichungsprozesses darstellt, auch der ursprüngliche Bau der Thylakoidmembran verändert wird. Zumindest könnte das für die großen Partikel gelten, von denen ja angenommen wird, daß sie eine spezielle Strukturkomponente der Grana darstellen.

Hieraus läßt sich ableiten, daß in den großen Partikeln nicht unbedingt das Chlorophyll lokalisiert sein muß, obwohl der Bleichungsprozeß dies zunächst annehmen ließ.

Auch MÜHLETHALER et al. ( 1965 ) wiesen auf eine mögliche strukturelle Bedeutung der von ihnen als Multienzymkomplexe bezeichneten großen Partikel hin. Diese Annahme steht in guter Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an Chloroplasten. Die von uns beobachteten großen Partikel, die offenbar mit den Multienzymkomplexen von MÜHLETHALER et al. (1965) identisch sind, scheinen nur bestimmte Regionen einer einheitlichen Fläche zu besetzen. Da die Grenze zwischen partikelbesetzter und partikelloser Membran ziemlich scharf ist, könnte man vielleicht annehmen, daß das Vorkommen der großen Partikel auf die Granaregion der Thylakoidmembran beschränkt ist. Dafür würde auch die Beobachtung sprechen, daß die großen Partikel meist auf Kreisflächen der angebrochenen Oberflächen angeordnet sind und somit der meist kreisrunden Aufsicht von Grana entsprechen. Da das Nebeneinander von partikelbesetzter und partikelloser Membran sich auch bei Chlorella nachweisen ließ, könnte man vermuten, daß die großen Partikel auch in den granaähnlichen Strukturen der Grünalgen für die Stabilität der Membranstapel verantwortlich zu machen sind.

Von GIESBRECHT und DREWS ( 1966 ) wurde die Existenz von Haftpunkten, die unseren großen Partikeln in der Funktion entsprechen könnten, bei Thylakoidstapeln von grünen Bakterien postuliert.

Man kann also für die großen Partikel eine rein strukturelle Bedeutung annehmen, zumal die photosynthetische Aktivität ja nicht allein auf die Granaregion beschränkt ist, sondern auch für die sogenannten Stromalamellen ( frets ) angenommen wurde ( vergl. WEIER und BENSON 1967). Mithin scheint den großen Partikeln nicht unbedingt eine funktionelle Bedeutung als kleinste autonome Einheit für die Photophosphorylierung zuzukommen. Gestützt wird diese Annahme durch die Befunde von IZAWA und GOOD ( 1965 ), wonach eine autonome photosynthetische Einheit ein Vielfaches von einem Quantasom betragen soll. Auch von BRANTON und PARK ( 1967) wurde für die Granaregion eine besondere Stabilität angenommen, die auf hydrophobe Bindungen zwischen benachbarten Thylakoiden zurückgeführt wird. Allerdings lokalisierten BRANTON und PARK ( 1967 ) die Bindungskräfte nicht in den großen Partikeln, da diese nach ihrer Interpretation sich innerhalb der Thylakoidmembran befinden sollen. Offenbar sind also diese hydrophoben Bindungen an keine elektronenmikroskopisch erkennbare Struktur geknüpft.

Aussichtsreich erscheint es, den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Partikel durch spezifisch enzymatische Verdauung und nachfolgende Gefrierätzung aufzudecken. Ein erster Anfang wurde von BAMBERGER UND PARK (1966) gemacht. Die Behandlung der Thylakoidmembranen mit Lipase und Protease führte zu einer Abnahme sowohl der Zahl als auch der Größe der großen Partikel. Da nach Proteasebehandlung die Partikel nur in der Größe reduziert werden, wird von den Autoren angenommen, daß sie aus Protein und Chlorophyll bestehen. Diese Auffassung stimmt in gewisser Weise mit der Vorstellung von KREUTZ ( 1968 ) überein, der innerhalb der Proteinpartikel das geordnete Chlorophyll b annimmt, widerspricht aber der von HOWELL und MOUDRIANAKIS ( 1967 ) vertretenen Ansicht, wonach die isolierten Partikel allein aus Protein bestehen sollen.

Aus den zum Teil einander widersprechenden Ergebnissen über das Quantasom wird deutlich, daß wir von einer so weitgehenden Analyse der Partikel, mit ihrer Funktionsbestimmung, wie sie von ODA et al. ( 1965 ) an Mitochondrien durchgeführt wurde, noch weit entfernt sind.

Weit voneinander abweichende Interpretationen sind auch von den kleinen Partikeln, die mit Hilfe der Gefrierätzung auf Thylakoidmembranen sichtbar werden, bekannt. Während MÜHLETHALER et al. (1965) diese regelmäßig zu beobachtenden Partikel als Proteinpartikel ohne nähere Funktionsangabe kennzeichnen, interpretieren BRANTON und PARK ( 1967 ) sie als Matrixmaterial,ohne auf ihre stoffliche Zusammensetzung und Funktion einzugehen.

Eine Deutung dieser in Ätzbildern konstant auftretenden Partikel, die wesentlich dichter als die großen Partikel angeordnet sind, erscheint aus den statischen Bildern allein schwierig. BAMBERGER und PARK ( 1966 ) haben über das Verhalten dieser Partikel nach Enzymbehandlung nichts ausgesagt. Da die kleinen Partikel in Gefrierätzbildern größenmäßig mit den von MURAKAMI ( 1966 ) nach Lipidextraktion mit Aceton identifizierten Partikeln übereinstimmen, wird angenommen, daß es sich hierbei um Proteinpartikel handeln könnte. Ob die kleinen Partikel eine Funktion in der Photosynthese ausüben oder ein reines Strukturelement der Thylakoidmembran darstellen, kann mit der Methode der Gefrierätzung allein nicht entschieden werden.

## Vergleich verschiedener Thylakoidmodelle

Die Befunde über den makromolekularen Bau, unter Einbeziehung der Erwägungen über die mögliche Funktion der in oder auf Thylakoidmembranen identifizierten Strukturen, sollen sich in einem Modell widerspiegeln (Abb. 52 ) , das hinsichtlich der Zuordnung der beiden Partikeltypen zu den Flächen der Thylakoidmembran den Vorstellungen von MÜHLETHALER et al. (1965) ähnelt ( vergl. Abb. 53 a).

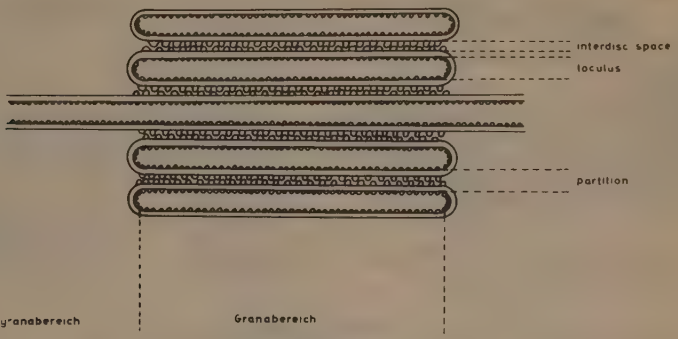



Abb. 52: Modellvorstellung über die Feinstruktur eines granaführenden Chloroplasten

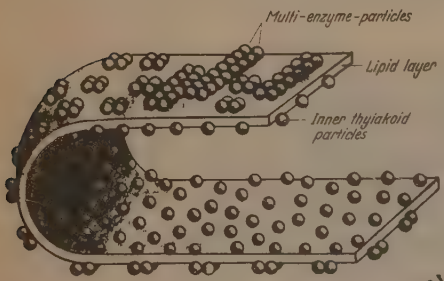
Es wird angenommen, daß die großen Partikel auf der Außenseite der Granathylakoide lokalisiert sind. Diese großen Partikel könnten für die große Stabilität der Grana verantwortlich sein, indem sie, von benachbarten Thylakoiden stammend, in dem sogenannten interdisc space miteinander verzahnt sind. Für diese Beobachtungen sprechen Befunde von MÜHLETHALER et al.(1965) sowie WEIER et al. (1966), wonach die partition eine geringere Dicke aufweisen soll als die Summe von zwei Einzelthylakoidmembranen ( fret membrane).

Der zweite identifizierte Partikeltyp wird, da er eindeutig andere Oberflächen als der große Partikeltyp besetzt, der Innenseite der Thylakoidmembran zugeordnet. In Übereinstimmung mit MÜHLETHALER et al. ( 1965 ) ( Abb. 53 a) können also drei Strukturkomponenten der Thylakoidmembran unterschieden werden:

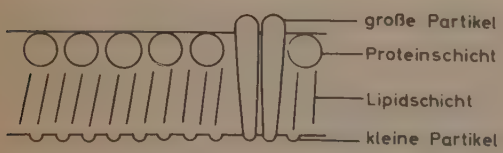
1. eine Trägermembran, die wahrscheinlich aus Lipiden besteht,
2. auf der Außenseite der Trägermembran locker verteilte große Partikel und
3. auf der Innenseite der Trägermembran dicht angeordnete kleine Partikel.

Von den beiden Partikeltypen wird angenommen, daß sie aus Proteinen bestehen.

Neuerdings nimmt MÜHLETHALER (1968)[x] an, daß zumindest ein Teil der großen Partikel durch die Membran hindurchreicht und somit auf beiden Seiten des Thylakoids zu erkennen ist ( Abb. 53 b ) .




a)




b)

Abb. 53:

Thylakoidmodelle

a.) MÜHLETHALER et al. (1965)

b.) MÜHLETHALER ( 1968 )

x) International Congress for Photosynthesis, Freudenstadt ( 4.6. bis 8.6.1968)

Im Gegensatz zu MÜHLETHALER et al. (1965 ) sowie MÜHLETHALER ( 1968 ) fanden sich bei unseren Untersuchungen jedoch keine Hinweise für die Perforation der Lipid-Trägermembran.

Aus unserem Modell ergibt sich, daß zwei verschieden strukturierte korpuskulare Proteinschichten eine Lipidschicht umgeben. Dies entspricht annähernd der Vorstellung von DANIELLI und DAVSON ( 1934), die eine Membran postulierten, die aus einer allerdings bimolekularen Lipidschicht , beidseitig von durchgehenden Proteinschichten umgeben, bestehen sollte.

Wenn man sich nun der Auffassung von MÜHLETHALER et al. (1965 ) anschließen würde, daß die Proteinpartikel bei der Fixierung entknäuelt werden und eine durchgehende Schicht bilden, ergibt sich das Bild einer Einheitsmembran ( vergl. ROBERTSON, 1959 ). Diese Einheitsmembran taucht in den ersten Vorstellungen über den Bau der Thylakoidmembran bei WOLKEN ( 1958 ) ( Abb. 54e ) sowie CALVIN ( 1959 ) ( Abb. 54c ) auf.

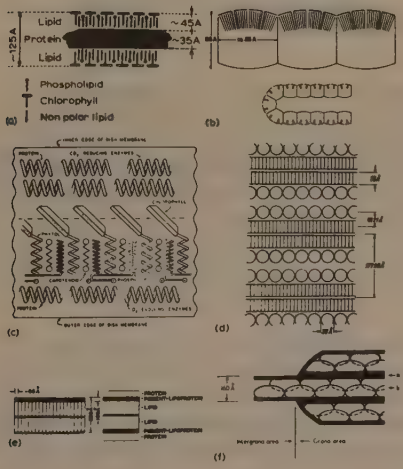



Abb. 54:

Thylakoidmodelle nach

a. HODGE et al. ( 1955 )
b. FREY-WYSSLING ( 1957 )
c. CALVIN ( 1959 )
d. KREUTZ und MENKE (1962 )
e. WOLKEN ( 1958 )
f. PARK und PON ( 1961 )

( aus FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER, 1965 ).

Im Gegensatz dazu wird von HODGE et al. (1955) angenommen, daß die Proteinschicht in der Mitte liegt und von Lipidschichten bedeckt wird ( Abb. 54a).

Von FREY-WYSSLING (1957) wurde erstmalig ein partikulärer Bau der Thylakoidmembran angenommen (Abb. 54b). Die Partikel sollten aus Lipoproteinen bestehen.

Im Unterschied zu den symmetrischen sandwichartigen Modellen gelangten KREUTZ und MENKE (1962) auf Grund von Röntgendaten zu einem asymmetrischen Bau der Thylakoidmembran, in der die Partikel in die Innenseite der Membran eingelagert sind .(Abb. 54d). Später wurde von MENKE (1965 und 1966) das Modell dahingehend geändert, daß die korpuskuläre Proteinschicht die Außenseite der Thylakoidmembran bildet (Abb. 55a) und zumindest bei Bakterien-Thylakoiden aus garnrollenartigen Partikeln bestehen soll ( Abb. 55b).

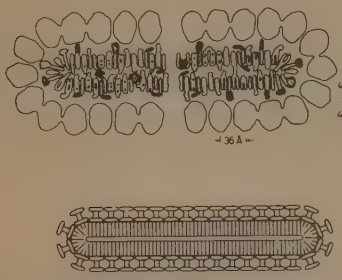



Abb. 55:

Modellvorstellungen von MENKE
a. ältere ( 1965 )
b. modifizierte jüngere (19

Der Modellvorstellung von MENKE entspricht im Prinzip auch die von KREUTZ (1968). Nur wurden mit Hilfe von Auswertungen der Elektronendichteverteilung sowie unter Berücksichtigung der Befunde über den Eigendichroismus (vergl. Einleitung) sehr präzisierte und eingehende Vorstellungen über die Verteilung sämtlicher am Aufbau der Thylakoidmembran beteiligter Komponenten entwickelt. So sollen die äußeren Proteinpartikel der Membran nicht garnrollenartig, sondern hohl sein und das Chlorophyll C 69 enthalten. Die Proteinpartikel ihrerseits sind in einem tetragonalen Flächengitter angeordnet ( Abb. 56).

Kürzlich ist von KREUTZ (1968)[x] dieses Modell dahingehend erweitert worden, daß sich über den Cytochromketten, die zwischen den Strukturproteinen angenommen wurden, 120 Å breite, quadratische, plattenförmige Partikel aufgelagert sein sollen. Diese "extramembranösen" Platten sollen u.a. ATPase und NADP-Reduktase enthalten und leicht entfernbar sein.

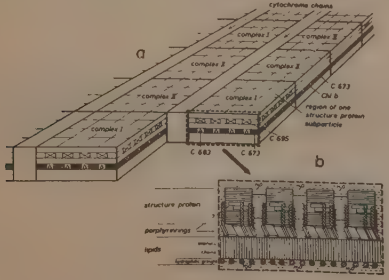



Abb. 56:

Thylakoidmembranmodell nach KREUTZ ( 1968)

x)

Auffallend ist jedoch, daß eine Gitterstruktur der Proteine mit Ausnahme von GIESBRECHT und DREWS ( 1966 ) bei Bakterienthylakoiden, nicht bestätigt werden konnte.

Im Unterschied dazu ließ sich mit Hilfe der Bedampfungstechnik an Thylakoiden höherer Zellen ein tetragonales Flächengitter nachweisen, das sich wahrscheinlich auf dem Thylakoid befand ( PARK und BIGGINS, 1964; HOWELL und MOUDRIANAKIS, 1967 ).

Von der Arbeitsgruppe um Park ( u.a. PARK und PON , 1961 ) wurde postuliert, daß die großen Partikel im Inneren der eigentlichen Thylakoidmembran liegen und beidseitig von Lipiden umgeben sind ( Abb. 54f). Ein solches Modell würde auch durch die Gefrierätzbefunde von BRANTON und PARK ( 1967 ) gestützt werden, allerdings nur dann, wenn man die Entstehung von Bruchebenen im Membraninneren annimmt ( Abb. 57).

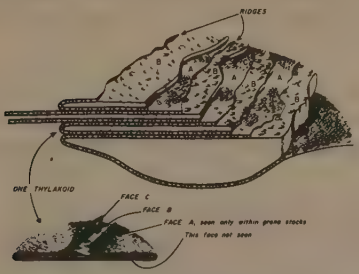



Abb. 57:

Thylakoidmodell nach BRANTON und PARK ( 1967 )

Eine ähnliche Verteilung von Lipiden und Proteinen nahmen WEIER und BENSON (1967) an ( Abb. 58).

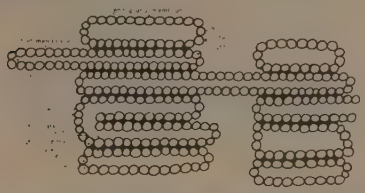


Abb. 58:

Thylakoidmodell nach WEIER und BENSON ( 1967)

Nach Vorstellung dieser Autoren, die sich auf Befunde an Dünnschnitten stützt, soll eine partikuläre Proteinschicht beidseitig von einem dünnen Lipidfilm bedeckt sein. Außerdem wird eine weitgehende Durchdringung der Proteine und Lipide angenommen. Der Durchmesser dieses einheitlichen Typs von Partikeln differiert erheblich von den Werten, die mit Hilfe anderer Techniken erzielt wurden.

Diese verschiedenen Modellvorstellungen zeigen, daß fast alle Anordnungen von Proteinen und Lipiden in der Thylakoidmembran, die überhaupt möglich sind, vertreten wurden.

Es besteht jedoch grundsätzlich die Möglichkeit, daß von den verschiedenen Autoren zwei Strukturen nicht klar voneinander unterschieden werden, nämlich die extramembranösen, plattenförmigen Partikelgitter, die der Membran nur aufliegen, und den eigentlichen Gitterstrukturen der Membran, so daß auch aus diesem Grunde so zahlreiche Modellvorstellungen entwickelt wurden.

Erst nach kritischer Durchleuchtung der angewandten Präparationsverfahren und unter Einbeziehung biochemischer Arbeitsmethoden wird es möglich sein, den wahren Bau der Thylakoidmembran aufzuklären.

Zum makromolekularen Bau der Mitochondrien

Im Unterschied zu den mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens meist klar darstellbaren Partikeln auf den inneren Chloroplastenmembranen, bereitete der Nachweis ihrer Existenz auf den inneren Mitochondrienmembranen Schwierigkeiten. Nur in ausgewählten Objekten scheinen sie, meist weniger deutlich als in Chloroplasten, beobachtbar ( vergl. MOOR et al, 1964; BRANTON und MOOR, 1964).

In den von uns untersuchten Objekten waren sie allein in Chlorella saccharophila eindeutig nachzuweisen. Der hierbei gemessene Durchmesser der Partikel von 90 - 100 Å stimmt etwa überein mit den Befunden anderer Autoren.

Die Existenz der Partikel konnte auch mit Hilfe anderer Methoden gesichert werden. So wurden von FERNANDEZ-MORAN et al. (1964) auf den Cristae der Mitochondrien, die aus Rinderherzen stammten, mittels Negativkontrastierung Partikel beschrieben. Diese Partikel wurden von den Autoren als Elementarpartikel bezeichnet. Auch mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik konnte jüngst die Existenz der Partikel auf den inneren Mitochondrienmembranen nachgewiesen werden ( FLEISCHER et al., 1967).

Deshalb kann, unter Einbeziehung aller bisher veröffentlichten Befunde, ein partikuläres Bauprinzip der inneren Mitochondrienmembranen ganz allgemein angenommen werden, obwohl seine Darstellung mit Hilfe der Gefrierätztechnik nur in besonderen Fällen gelingt.

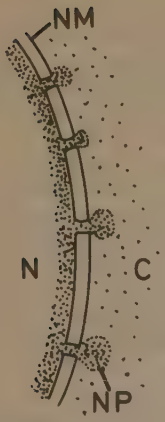
## Zum Bau der Kernmembran

### Bau der Kernpore

Im Gegensatz zu den beiden bisher diskutierten partikulären Organellmembranen der Chloroplasten und Mitochondrien mit exponierter Beteiligung am Zellstoffwechsel, müssen Kern - und Cytoplasmamembran im Sinne von Grenzmembranen verstanden werden. Es ist zu erwarten, daß sich dies auch in der Struktur der beiden Membransysteme widerspiegelt.

Übereinstimmend zu allen bisher vorliegenden Ergebnissen an Kernen der systematisch verschiedensten Organismen, auf die in der Literaturübersicht eingegangen wurde, ließ sich die Kernhülle von den Dinoflagellaten bis hin zu den höheren Pflanzen und tierischen Organismen mit Hilfe der Gefrierätztechnik als Doppelmembran darstellen. Die beiden Membranen waren durch den perinuclearen Spaltraum voneinander getrennt. Regelmäßig erschien die Kernmembran von Poren durchbrochen. Für diese Poren wurden von verschiedenen Autoren stark voneinander abweichende Durchmesser angegeben ( vgl. Literaturübersicht). Die Unterschiede müssen in der Hauptsache auf die bisher verwandten Präparationstechniken zurückgeführt werden. So erklärt WATSON (1959) die mit Hilfe der Dünnschnitt-Technik erhaltenen stark variierenden Werte damit, daß die Lage der Schnittebene in Bezug auf den Kern vielfach für die verschiedenen Porendurchmesser verantwortlich zu machen ist. Tatsächlich lagen in unseren Untersuchungen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens, bei dem die Schnittebene keine Rolle spielt, die Porendurchmesser nie unter 800 Å. Die größten Poren wurden bei höheren Pflanzen und menschlichen FL-Zellen mit etwa 1600 Å gemessen, obwohl auch Durchmesser von 850 Å vorkamen. Bei Dinoflagellaten variierten die Porendurchmesser weit weniger stark. In der Regel lagen sie bei 900 Å. Das mag z.T. daran liegen, daß die Poren bei dieser Organismengruppe eng nebeneinander in einem bestimmten Muster angeordnet und damit auch gleichzeitig morphologisch festgelegt sind. Hierauf wird noch an anderer Stelle näher eingegangen. Bei den höheren Pflanzen variieren die Porendurchmesser innerhalb einer Art erheblich (850-1600 Å). BRANTON und MOOR ( 1964 ) fanden in Zwiebelwurzelspitzen ähnliche Unterschiede und führten das darauf zurück, daß die Kerne aus verschiedenen Geweben stammten und unterschiedliche Stadien der Entwicklung repräsentierten. Im Gegensatz dazu nehmen wir auf Grund unserer Befunde an quergebrochenen Kernmembranen an, daß die mitunter beträchtliche Variation im Porendurchmesser keinem wahren Wert entspricht, sondern vorgetäuscht wird durch mehr oder weniger stark aus den Poren tretendes Kernmaterial ( Abb. 59).

Die Erklärung für die Darstellung des aus den Poren austretenden Kernmaterials liegt im Gefrierätzverfahren selbst. Bei dem Vorgang des Brechens werden nämlich Phasengrenzen erfaßt. Da zwischen Kern- und Cytoplasma ein solcher Phasenunterschied besteht, kenntlich an der unterschiedlichen Körnung in Gefrierätzbildern, wird der Bruch an der Pore entlang des ausgetretenen Kernmaterials erfolgen.




N = Kern
C = Cytoplasma
NM = Kernhülle
NP = Kernpore

Abb. 59:
Schematische Darstellung des aus den Poren austretenden Kernmaterials

Daß es sich hierbei nicht um angebrochene Schläuche des endoplasmatischen Retikulums handeln kann, ist an dem Fehlen von membranösen Strukturen innerhalb des austretenden körnigen Kernmaterials zu erkennen.

Zweifellos repräsentiert die Stärke des Austritts verschiedene physiologische Aktivitäten des Kerns. Lokale Aktivitätsunterschiede des Kerns könnten also Poren mit verschieden stark austretendem Kernmaterial widerspiegeln.

Ähnliche Aktivitätsunterschiede des Kerns wurden auch von MOOR und MÜHLETHALER (1963 ) bei alten Hefezellen vermutet, da sie auf der Kernmembran Porenfelder von scheinbar glatten Membranflächen mit geschlossenen Poren unterscheiden konnten. Für die Existenz dieser geschlossenen Poren fanden sich in Zellen von höheren Pflanzen keine Hinweise. Stets schienen die Poren sowohl in embryonalen als auch in parenchymatischen Zellen statistisch über die Oberfläche des Kerns verteilt.

Verschiedene Aktivitätszustände der Zelle können sich jedoch in der absoluten Zahl der Poren pro Kernhülle widerspiegeln. So wurde in embryonalen Zellen der pflanzlichen Gewebekultur ihre Zahl auf etwa 2000 pro Kern, in parenchymatischen Zellen auf etwa 300 pro Kern geschätzt.

Aus den Befunden über den Porendurchmesser ergibt sich, daß unterschiedliche Werte bei verschiedenen Arten für eine Aufstellung phylogenetischer Gesetzmäßigkeiten nicht geeignet sind, da schon innerhalb eines Organismus der wahre Durchmesser durch austretendes Kernmaterial maskiert werden kann.

Desgleichen besteht die Möglichkeit, daß das pilzförmig austretende Kernmaterial eine vorhandene Symmetrie der Pore verhüllt. Von WISCHNITZER ( 1958 ) wurde durch Auswerten von Dünnschnitten erstmalig eine octogonale Symmetrie für die Poren von Triturusoocytenkernen beschrieben. Zur gleichen Symmetrie gelangte GALL (1967 ) mit Hilfe von Negativkontrastierung isolierter Kernhüllen von Amphibien, während GAY ( 1956 ) für die Poren von Speicheldrüsenkernen bei Drosophila eine pentagonale oder hexagonale Symmetrie annahm. Im Gegensatz dazu ließ sich in den von uns untersuchten Dinoflagellaten und schwächer auch in Euglenen nur eine hexagonale Symmetrie der Kernporen rekonstruieren. Bei der dichten Anordnung der Poren, besonders auf der Kernoberfläche der Dinoflagellaten, erscheint eine hexagonale Symmetrie aus räumlichen Gründen am einleuchtendsten.

Anordnung der Poren auf der Kernoberfläche

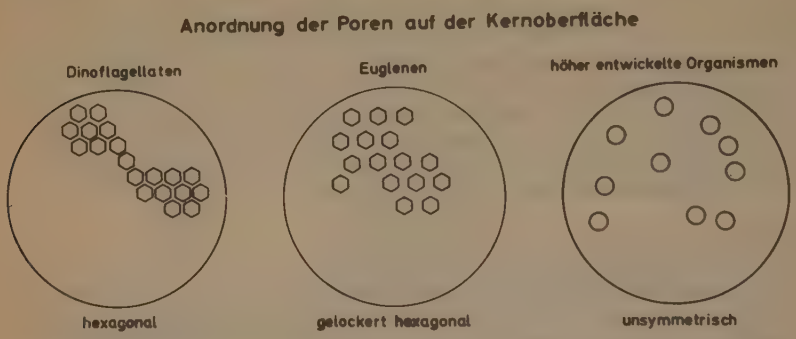
Diese hexagonale Symmetrie konnte nicht nur im Bau jeder einzelnen Pore verfolgt werden, sondern auch in der Anordnung der Poren in einer sogenannten Porengruppe. Das galt, wenn auch schwächer, für Euglenen , weil der Abstand zwischen den Poren größer als bei Dinoflagellaten war. Dies drückt sich auch in den quantitativen Werten (Tab. VI) aus. Das Auseinanderweichen der Poren bei den Euglenen könnte eine bedeutsame Zwischenstufe darstellen. Bei allen höher entwickelten Organismen ließen sich nämlich in der Anordnung der Poren auf der Kernoberfläche keine symmetrischen Beziehungen " mehr " feststellen. Dies wird auch veranschaulicht durch den variablen Abstand der Poren zueinander. Zudem war der mittlere Abstand stets größer als bei Dinoflagellaten und Euglenen ( Tab. VI).

Tabelle VI: Durchmesser und Abstände der Poren auf der Kernoberfläche

| Objekt | mittlerer Durchmesser der Kernporen in Å | mittlerer Abstand der Kernporen in Å |
|---|---|---|
| Dinoflagellaten | 900 | 1250 |
| Euglena | 950 | 1700 |
| Chlorella | 1200 | 2800 |
| Penicillium | 950 | 2600 |
| Asplenium | 900 | 2700 |
| Daucus | 1100 | 2500 |
| Crocus | 1150 | 2400 |
| Rhinanthus | 1150 | 2400 |
| FL-Zellen | 900 | 2400 |

Die sich hier abzeichnende Entwicklung des Ordnungszustandes der Kernporen soll in einer Schemazeichnung veranschaulicht werden ( Abb. 60).

Abb. 60:




Eng gekoppelt mit dem Problem der Symmetrie ist möglicherweise das Auftreten von Partikeln oder tubulären Strukturen im Lumen der Poren. In allen untersuchten Arten waren 5 - 9 Partikel innerhalb einer Pore zu unterscheiden. Es ist schwer zu sagen, ob diese Partikel mit den von POLLISTER et al. (1954 ) beschriebenen fadenähnlichen Strukturen, die die Poren von Kernmembranen der Amphibienoocyten durchziehen sollen, identisch sind. Auch GALL ( 1954 ) und WISCHNITZER ( 1958 ) beobachteten Partikel, die möglicherweise mit der octogonalen Symmetrie zusammenhängen, da es stets 8 an der Zahl waren. Auch an pflanzlichen Objekten ( Kernhüllen von Erbsenkeimlingen ) wurden Granula im Porenzentrum beschrieben, die von 8 Subannuli umgeben sein sollen ( YOO und BAYLEY, ( 1967). Möglicherweise sind die Partikel auch mit den Subannuli identisch. Die Annuli und Subannuli sollen nach GALL ( 1967 ) von der eigentlichen Pore unabhängige Strukturen sein, während WATSON ( 1955 ) annimmt, daß Pore und Annulus in Dünnschnitten nur zwei verschiedene Schnittebenen durch ein und dieselbe Pore darstellen.

Für die Existenz der Annuli oder Subannuli im Sinne Gall's fand sich in unseren Gefrierätzbildern kein Hinweis. Das steht in Übereinstimmung mit den Befunden von MOOR und MÜHLETHALER ( 1963 ) an gefriergeätzten Hefezellen. Die häufig beobachteten Granula innerhalb der Pore werden von uns nicht als Subannuli gedeutet, sondern als Erscheinungsbild des granulären Kernplasmas, das stets gröber gekörnt erschien als das Cytoplasma.

Auch GAY ( 1956 ) gelangte zu einer ähnlichen Schlußfolgerung, indem sie die im Zentrum der Poren befindlichen Granula als austretendes Kernplasma ansah.

In diesem Zusammenhang erscheint auch die Frage interessant, ob das von einigen Autoren ( u.a. PAPPAS, 1956 ) beschriebene Diaphragma, das die Poren verschließen soll, in Gefrierätzpräparaten existent war. Wenn ein solches Häutchen vorhanden gewesen wäre, hätte es mit Hilfe der Gefrierätztechnik dargestellt werden müssen, da die Brüche vorwiegend entlang von Membranen erfolgen. Eine die Poren abschließende Membran konnte jedoch nie beobachtet werden.

Mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens waren quantitative Aussagen über die Verteilung der Poren auf der Kernoberfläche leichter als mit Hilfe anderer Methoden möglich, da durch die Lage der Brüche große auswertbare Flächen freigelegt wurden. Damit kann nicht nur die Zahl der Poren pro Flächeneinheit ermittelt werden, sondern es sind auch Angaben über die absolute Zahl der Poren pro Kern möglich. Aus Tabelle VI,( S. 79 ) wird ersichtlich, daß die Durchmesser der Kernporen sämtlich untersuchter Organismen etwa in einem Bereich liegen. Abgesehen davon würde sich der Durchmesser ohnehin nicht für die Aufstellung etwaiger Gesetzmäßigkeiten eignen, da er, wie gezeigt wurde, stark von Aktivitätszuständen des Kerns abhängig ist. Dagegen kommen möglicherweise phylogenetisch bedingte Unterschiede im mittleren Abstand der Kernporen voneinander zum Ausdruck. Allerdings wurden bei Dinoflagellaten und Euglenen nur die Kernoberflächen berücksichtigt, die von Poren durchbrochen waren.

## Funktion der Kernmembran

Die Funktion der Kernhülle in der Zelle kann in erster Linie als mechanische Begrenzung verstanden werden. Dadurch wird verhindert, daß Kern - und Cytoplasma sich miteinander vermischen. Damit aber auch Makromoleküle, beispielsweise RNS-Stränge als Informationsträger vom Kern in das Cytoplasma gelangen können, muß die Membranbarriere perforiert sein. Solche Perforationen stellen die Poren dar, die eine Kommunikation ermöglichen. Vor allem an Querbrüchen der Kernhülle ließ sich der Austritt des Kernmaterials zeigen. Jedoch können offensichtlich Makromoleküle in umgekehrter Richtung die Poren passieren, wie von FELDHERR ( 1962 ) mit Hilfe von kolloidalem Gold demonstriert wurde. In den von uns untersuchten Objekten konnte dieser umgekehrte Transportweg, der sich als Einstülpung des Cytoplasmas in den Kernraum hätte darstellen müssen, nicht beobachtet werden.

Neben den Poren spielt wahrscheinlich das endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle als Transportsystem. Dies findet morphologisch seinen Ausdruck in dem Kontakt des ER mit der Kernhülle, der vor allem in pflanzlichen Gewebekulturen nachzuweisen war.

Im Gegensatz zu Gefrierätzpräparaten konnte an Dünnschnitten festgestellt werden, daß das ER allein mit der äußeren Kernhülle verschmolzen ist. Damit steht der Inhalt der Schläuche des ER mit dem perincluearen Spaltraum in Verbindung.

Da sowohl der perinucleare Spaltraum als auch die Schläuche des ER von einer wässrigen Phase erfüllt sind ( vergl. MOOR und MÜHLETHALER, ( 1963 ) , ist hierin eine Bestätigung der eingangs erwähnten Komparti-menttheorie zu sehen, wonach immer gleiche Phasen in der Zelle komunizieren sollen. In der gleichen Richtung ist der Kontakt der beiden plasmatischen Phasen des Kernplasmas und des Cytoplasmas durch Vermittlung der Poren zu verstehen.

Es erscheint denkbar, daß über die Schläuche des ER niedermolekulare Bausteine in den perinuclearen Spaltraum gelangen und von dort durch die innere Kernmembran in das Kernplasma diffundieren. Auf dem umgekehrten Wege könnten Makromoleküle vom Kernplasma durch die Poren in das Cytoplasma kommen.

## Zum Bau der Cytoplasmamembran

### Invaginationen

Ein weiteres Membransystem der Zelle stellt die Cytoplasmamembran oder Plasmalemma als Grenzfläche zwischen Protoplasma und Außenmedium bzw. Zellwand dar. Hinsichtlich des Baues der Cytoplasmamembran ( CM ) ließen sich die von uns untersuchten Organismen in zwei große Gruppen aufteilen:

1. Organismen, deren CM auffällige meist längliche Invaginationen aufweist

   und

2. Organismen ohne solche Invaginationen inder CM.

Zu der ersten Gruppe gehören Chlorella, Penicillium und Schizosaccharomyces und zu der zweiten Gruppe sämtliche anderen untersuchten Organismen.

Die Baueigentümlichkeit der CM bei der untersuchten Grünalge einerseits und den Pilzen andererseits wirft die Frage auf, ob hierin verwandschaftliche Beziehungen zwischen den beiden Organismengruppen zum Ausdruck kommen. Eine endgültige Klärung dieser Frage muß weiteren Untersuchungen an einer größeren Zahl von Objekten vorbehalten bleiben.

Da die Invaginationen offenbar eine für die Art spezifische Form und Länge besitzen, ist auch zu untersuchen, inwieweit sich quantitative Aussagen ( Anzahl und Länge der Invaginationen ) für eine Klärung von Verwandschaftsverhältnissen verschiedener Arten oder Gattung eignen. Ähnliche Invaginationen wurden bisher nur bei Saccharomyces beschrieben ( MOOR und MÜHLETHALER 1963 ) .

Für die Frage nach der Funktion dieser Invaginationen erschien von Bedeutung, daß sie bei Chlorella quer zur Längsachse der Zelle auf der CM orientiert waren. Daher wurde zunächst eine die Zelle stabilisierende Funktion vermutet. Bei Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, konnte jedoch eine auffällige Veränderung der Invaginationen beobachtet werden. Die zunächst länglichen Invaginationen nahmen eine ringförmige Gestalt an. Da das Ringinnere oftmals angebrochen ist, wird vermutet, daß die sonst stabile CM an diesen Stellen von Bläschen durchbrochen wird. Die Gestaltsänderung der Invaginationen in wachsenden Zellen läßt die Annahme zu, daß die Invaginationen vielleicht unter anderem auch eine aktive Rolle im Bläschentransport durch die CM spielen.

Partikelbesatz und mögliche Funktion der Partikel

Ein weiteres Charakteristikum der CM kann das Auftreten von Partikeln bei einer großen Zahl von Organismen sein. Diese Partikel sind in jedem Fall regellos über die Oberfläche der CM verteilt. Besonders dicht waren sie auf peripheren Membranstrukturen von Euglena angeordnet. Bei allen anderen untersuchten Organismen war ihre Zahl pro Flächeneinheit wesentlich geringer. Der Durchmesser ( etwa 100 Å ) der von uns vermessenen Partikel steht in guter Übereinstimmung mit den von STAEHELIN ( 1966 ) bei Chlorella und BAUER ( 1967 ) bei Acanthamoeba angegebenen Werten. In Hefen hatten die Plasmalemmapartikel jedoch einen Durchmesser von 150 Å ( MATILE et al. 1967 ). Partikel, die hexagonal auf der CM von Hefezellen angeordnet waren, beschrieben MOOR und MÜHLETHALER ( 1963 ). Allerdings waren immer nur Teile der CM von diesen kristallin angeordneten Partikeln bedeckt. Da aber die von den Autoren gleichfalls beschriebenen Invaginationen als Erhebungen der CM vorliegen, bei uns jedoch immer als Einfaltungen, ist anzunehmen, daß die von MOOR und MÜHLETHALER ( 1963 ) beschriebenen hexagonalen Partikelfelder, auf der Innenseite der CM lokalisiert sind. Mithin müssen sie mit den von uns beschriebenen Partikeln auf der Außenseite des Plasmalemmas nicht identisch sein.

Auch mit Hilfe der Negativkontrastierung ließen sich Partikel mit allerdings weit geringerem Durchmesser auf der CM von Rattenleberzellen nachweisen ( BENEDETTI und EMMELOT 1965 ). Die von diesen Autoren nachgewiesene hexagonale Ordnung dieser Partikel auf der CM trat nur unter bestimmten Bedingungen auf. Ähnliches konnte in unseren Gefrierätzbildern nicht demonstriert werden. Der mit Hilfe verschiedener Methoden nachgewiesene Partikelbesatz der CM steht im Gegensatz zu der Auffassung von SJÖSTRAND und ELFVIN (1964), wonach die Partikel auf den Membranen Präparationsartefakte sein sollen. Da bei der Gefrierätztechnik Fixierungs - und Einbettungsartefakte, wie sie bei der Dünnschnitt-Technik auftreten können, weitgehend ausgeschaltet sind, erscheint die Existenz der Partikel real, zumal auch in anderen Membransystemen , wie den Thylakoiden in Chloroplasten und den Christae der Mitochondrien, ein partikulärer Bau nachgewiesen wurde ( MÜHLETHALER et al. 1965 ;

BRANTON und PARK , 1967 ; MOOR et al., 1964 ; FERNANDEZ-MORAN et al., 1964). Auch auf der Vakuolenmembran können Partikel lokalisiert sein, wie von MOOR und MÜHLETHALER (1963) an Hefezellen nachgewiesen wurde. Dagegen scheinen sich auf den Membranen des glatten und rauhen ER von Rattenleberzellen nach Befunden von BENEDETTI und EMMELOT (1965) keine Partikel zu befinden. Auch in den von uns untersuchten Objekten fehlen Hinweise für einen partikulären Bau der ER-Membranen. Ebensowenig wurden Partikel auf den Membranen des Golgisystems beobachtet.

Die Frage nach der Funktion der Partikel auf der Cytoplasmamembran ist im jetzigen Stadium der Untersuchungen nur schwer zu beantworten. Für die Partikel auf der CM von Hefezellen nahmen MATILE et al. (1967) einen Aufbau aus Glycoproteinen an. Die Partikel sollen im Dienst der Zellwandsynthese stehen und schließlich in das fibrilläre Netzwerk mit eingebaut werden. Gleicher Ansicht war STAEHELIN (1966), der zudem quantitative Unterschiede im Partikelbesatz von verschiedenen Entwicklungsstadien bei Chlorella nachweisen konnte.

Eine ähnliche Korrelation zwischen Partikelbesatz der CM und Entwicklungszustand der Zellen scheint auch für höhere Pflanzen zuzutreffen, denn in den parenchymatischen, weitgehend differenzierten Zellen der pflanzlichen Gewebekulturen konnten nur sehr selten Partikel auf der CM beobachtet werden, während in den embryonalen Zellen von Rhinanthus die CM von Partikeln meist dicht besetzt war.

Dieser Unterschied im Partikelbesatz der beiden Zelltypen ließe sich damit erklären, daß bei aktiv wachsenden Zellen die Partikel in Verbindung mit einer stattfindenden Zellwandsynthese stehen, während in ausdifferenzierten Zellen die Synthese des Wandmaterials abgeschlossen ist, und damit auch die Partikel fehlen.

Ein Umstand paßt jedoch nicht ganz in dieses Bild der Partikelfunktion: die relativ hohe Ordnung der Zellulosefibrillen in paralleltexturierten Wänden, wie sie sich in Gefrierätzbildern darstellen ließ, spiegelte sich nicht in der Anordnung der Partikel auf der Cytoplasmamembran wider. Stets waren die Partikel nämlich statistisch ohne erkennbares Ordnungsprinzip auf der CM verteilt. Damit scheint fraglich, ob die Partikel mit der Synthese der Zellulosemikrofibrillen in Verbindung stehen.

Diese Schwierigkeiten lassen sich vielleicht mit der Annahme umgehen, daß die Partikel bei höheren Pflanzen ganz allgemein mit der Synthese des Matrixmaterials der Zellwand zusammenhängen.

Eine Entscheidung dieser Frage läßt sich nur treffen, wenn die Partikel von isolierten Cytoplasmamembranen biochemisch untersucht werden.

Auf der CM menschlicher Zellen ( FL-Zellen ) ließen sich mit Hilfe der Gefrierätztechnik keine Partikel feststellen. Dagegen konnten BENEDETTI und EMMELOT ( 1965 ) auf isolierten Cytoplasmamembranen von Pankreaszellen der Ratte mit Hilfe der Negativkontrastierung dichten Partikelbesatz beobachten. Von isolierten Membranen läßt sich jedoch nicht sagen, auf welchen Seiten die Partikel sitzen. Die von BENEDETTI und EMMELOT ( 1965 ) nachgewiesenen Partikel könnten also auch auf der Innenseite der CM lokalisiert sein.

Wenn sich bestätigen sollte, daß die Außenseite der CM von tierischen Organismen keinen Partikelbesatz aufweist, während die von pflanzlichen Organismen Partikel in Verbindung mit der dort stattfindenden Zellwandsynthese besitzt, ergäbe sich daraus ein prinzipieller Unterschied von pflanzlichen und tierischen Organismen.

## Zum Bau des Golgi- Apparates

Ebenso wie andere Membransysteme ließ sich auch der Golgi-Apparat mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens gut darstellen. Aus Querbrüchen ergab sich das von der Dünnschnitt-Technik her bekannte Bild. In Tangentialbrüchen konnte bei Gewebekulturzellen ein Zentralkörper im Dictyosom beobachtet werden, über dem lamellare Zisternen angeordnet waren, während in Brüchen entlang den Zisternen deren Struktur sichtbar wurde. Hierbei ließ sich das von DRAWERT und MIX ( 1961/1962 ) veröffentlichte Modell bestätigen, wonach ein Dictyosom aus mehreren lamellaren Zisternen besteht, die periphär Bläschen abschnüren. Für ein von MOLLENHAUER und MORRE ( 1966 ) publiziertes Modell, nach dem sich eine Zisterne in eine Vielzahl von Tubuli auflösen soll, fand sich in unseren Objekten kein Anhaltspunkt. Ebensowenig konnten die von den Autoren postulierten Tubuli, die verschiedene Dictyosomen eines Golgi-Apparates miteinander verbinden sollen, nachgewiesen werden.

Die Membran der Zisternen scheint im Gegensatz zu einigen anderen schon erwähnten Membransystemen ohne Partikelbesatz. Auch nach Befunden von CUNNINGHAM et al. (1966), SJÖSTRAND ( 1963 ) sowie YAMAMOTO ( 1963 ) sollen die Membranen des Golgisystems sich morphologisch von anderen Cytomembranen unterscheiden.

Über die Funktion des Organell läßt sich anhand von Gefrierätzbildern kaum etwas aussagen, da cytochemische Methoden nicht angewendet werden können. Nur im Falle der Euglenen konnten Anhaltspunkte für einen Zusammenhang des Golgiapparates mit den Multivesikular Bodies gefunden werden, die eine Genese der MVB aus den Dictyosomen vermuten lassen.

Unterschiede im Bau des Golgiapparates wurden nur zwischen Euglenen mit einer großen Zahl von Zisternen ( etwa 20 ) und allen anderen höher entwickelten Organismen mit 4 - 10 Zisternen nachgewiesen.

## Zu den Multivesicular Bodies

Erst in den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß die Multivesicular-Bodies ( = MVB ) im Organismenreich weit verbreitet sind (siehe Literaturübersicht). Allerdings ist die Frage zu stellen, ob es sich bei den in verschiedensten Organismen nachgewiesenen MVB um identische Strukturen handelt. Häufig wurden auch verschiedene Begriffe für diese Organelle verwendet. So bezeichneten SOMMER und BLUM ( 1965 ) MVB-ähnliche Gebilde in Euglenen als peri-reservoir vesicles. Im Gegensatz zu von uns beobachteten MVB mit meist doppelter Hüllmembran wurden die peri-reservoir vesicles als hüllenlos angegeben. Ebenso ist zweifelhaft, ob die von LEEDALE et al. (1965) in Euglena nachgewiesenen phospholipid vesicles und die von uns genannten MVB ein und dasselbe Organell sind. An diesem Beispiel ist zu erkennen, daß die Identitätsfrage schwer zu klären ist, zumal das Gefrierätzverfahren sich im Gegensatz zur Dünnschnitt-Technik nicht mit cytochemischen Methoden koppeln läßt.

In den von uns untersuchten Organismen konnten grundsätzlich zwei Typen von Organellen unterschieden werden:

1. Säckchen, deren Inneres von annähernd gleich großen Bläschen eingenommen wurde und
2. Säckchen, deren Inneres aus erheblich voneinander differierenden Bläschen und einem mehr oder weniger großen Matrixanteil bestand.

Der erste Typ von MVB fand sich nur in Gewebekulturzellen der Karotte und scheint mit den von HALPERIN und JENSEN (1967) beschriebenen MVB in Gewebekulturen der Wildkarotte identisch zu sein. In Übereinstimmung mit diesen Autoren kommen die MVB offenbar nur in syntheseaktiven Zellen vor. Deshalb wird ihnen auch eine bestimmte Syntheseleistung, z.B. Beteiligung am Zellwandaufbau zugeschrieben. Diese Annahme wird durch Befunde von ECHLIN (1966) an stoffwechselaktiven Tapetumzellen von Ipomea gestützt, da die MVB in diesen Zellen direkt mit der Zellwand verbunden sind.

Andererseits könnte der Kontakt mit der Zellwand auch im Sinne einer Pinocytose gedeutet werden. Tatsächlich wurde von einigen Autoren ( NOVIKOFF und CHIN , 1964 ; ROSENBLUTH und WISSIG, 1964) angenommen, daß die MVB mit pinocytotischen Vorgängen in der Zelle zusammenhängen. Mit Sicherheit läßt sich von den MVB in pflanzlichen Gewebekulturen nicht sagen, ob sie mit Prozessen der Pinocythose oder der Zellwandsynthese in Verbindung stehen.

Anders ist das bei den MVB, die in menschlichen FL-Zellen identifiziert wurden. Aufgrund der meist langgestreckten Gestalt kann vermutet werden, daß es sich hierbei um ein zur Peripherie wanderndes Organell handelt, das seinen Inhalt an der Zellgrenze unter Platzen der Hüllmembran an das Außenmedium abgibt. Als Inhalt werden Stoffwechselendprodukte vermutet, die auf diese Weise aus der Zelle ausgeschleust werden könnten. Hier stände das Organell also nur im Dienste des Katabolismus, zumal ja eine Beteiligung an der Zellwandsynthese bei diesem tierischen Zelltyp nicht in Frage käme. Ein Zusammenhang der MVB mit morphogenetischen Prozessen, wie von SCHWARZ ( 1966) im Blastem der Extremitätenknospen der Ratte vermutet, kann bei den FL-Zellen ausgeschlossen werden. Auch wird eine Beteiligung der MVB an autolytischen Prozessen, wie sie WEISSENFELS ( 1967 ) beschrieb, kaum zutreffen ; innerhalb der MVB ließen sich nämlich nie Membranreste, die bei Autolyse von Organellen ( Mitochondrien ) auftreten, beobachten.

Dagegen konnten in MVB bei Euglenen Membranreste, die auf autolytische Prozesse schließen lassen, nachgewiesen werden. Dieser Typ wurde von de DUVE ( 1963 ) als Cytolysomen bezeichnet. In Euglenen wurde ein sehr variables Erscheinungsbild der MVB festgestellt. Von dicht mit Bläschen gefüllten Organellen bis zu solchen, wo neben 1 - 2 Bläschen fast nur Matrix das Innere ausfüllte, konnten verschiedene Zwischentypen auftreten. Diese verschiedenen Erscheinungsformen würden sehr gut in das Bild eines autolytischen Organells passen. Bei den Euglenen fand sich der einzige Hinweis für eine mögliche Genese der MVB, denn es konnte ein Kontakt mit dem Dictyosom beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen MVB-Typen war die Hüll - membran durch die Bläschen deutlich ausgebeult, und konnte von ihnen lokal passiert werden.

Auf Grund der Untersuchungen wird angenommen, daß die MVB in verschiedenen Organismen nach Morphologie und Funktion keinen einheitlichen Typus repräsentieren.

Zur Frage des unit-membrane- Konzepts

Als Fazit der Untersuchungen an verschiedenen Membransystemen mit Hilfe des Gefrierätzverfahrens erscheint die Frage besonders interessant, inwieweit sich die Gefrierätzbefunde mit bisherigen Membranvorstellungen vereinbaren lassen.

Als Grundkonzept für den Membranbau gilt die unit-membrane-Hypothese von ROBERTSON ( 1959 ), die in mancher Beziehung dem Membranmodell nach DANIELLI und DAVSON ( 1934 ) entsprach. Dabei scheinen vor allem zwei Aspekte bemerkenswert:

1. die unit-membrane besteht aus einem bimolekularen Phospholipidfilm, dessen apolare Anteile ( Fettsäureketten ) quer zur Ebene der Membran orientiert und beidseitig von Proteinschichten bedeckt ist, und
2. diese grundlegende Struktur soll für alle Membranen in Zellen sämtlicher Organismen gelten.

Diese Aussagen stützten sich vor allem auf Befunde an Dünnschnitten nach $OsO_4$- oder $KMnO_4$- Fixierung.

In jüngerer Zeit wurde jedoch an der Existenz dieser Elementarmembran gezweifelt. Das beruht z.T. auf einem Mißtrauen gegenüber den verwendeten Fixierungsmitteln. So konnte selbst nach vollständiger Lipidextraktion die unit membrane in Mitochondrien mit Hilfe der $OsO_4$-Fixierung nachgewiesen werden ( FLEISCHER et al., 1967).

Zudem waren von SJÖSTRAND ( 1963 ) in den elektronentransparenten Schichten der Mitochondrienmembranen erstmalig globuläre Einheiten nachgewiesen worden.

Für die Existenz von Partikeln in oder auf Membranen sprachen auch die Befunde von BENEDETTI und EMMELOT ( 1965 ) an negativkontrastierten Cytoplasmamembranen von Rattenleberzellen. Der Nachweis der hexagonal angeordneten Partikel auf der CM widersprach ebenfalls einer Generalisierung der unit membrane-Hypothese.

In gleicher Richtung müssen auch die Befunde physikalischer Untersuchungen interpretiert werden, denn von GREENHAM ( 1966 ) wurden beträchtliche Differenzen im elektrischen Widerstand zwischen CM und Tonoplast gemessen.

Genährt werden diese Zweifel an der Allgemeingültigkeit des unit-membrane- Konzepts vor allem durch die Gefrierätzbefunde.

So dürfte nach der elektronenmikroskopischen Auswertung der Gefrierätzbilder für einen Teil der Membransysteme ein partikulärer Bau als sicher gelten. Während sich auf bzw. in Thylakoidmembranen regelmäßig zwei Typen von Partikeln nachweisen ließen, konnte auf den Cristae der Mitochondrien in Übereinstimmung mit anderen Befunden nur ein Typ von Partikeln identifiziert werden. Nach unseren Untersuchungen muß auch für einen Teil der Cytoplasmamembranen ein partikulärer Bau angenommen werden.

Darüberhinaus ließ sich in einigen Fällen, so z.B. auf Thylakoidmembranen nach Bleichung sowie auf Cytoplasmamembranen der FL-Zellen, eine fibrilläre Textur mit wabenförmigen Muster auf der Membran beobachten.

Vielleicht wäre das im Sinne von LUZZATI und HUSSON ( 1962 ) so zu deuten, daß beide Formen, sowohl die blattartige als auch die fibrilläre, nebeneinander vorkommen können.

Selbst an dem klassischen Objekt des Nervenscheidenmyelins, das den Ausgangspunkt für das unit-membrane-Konzept von Robertson bildete, wurde von BISCHOFF und MOOR (1967 ) kürzlich ein asymmetrischer Bau nachgewiesen, der gegen eine dreischichtige symmetrische Struktur der Membran sprechen würde.

Somit scheinen die Membranen als Grenzflächen der Kompartimente mit unterschiedlichen Transportphänomenen ( CM, Kernmembran ) oder als Sitz von Enzymen ( Thylakoide ) im Hinblick auf ihre Funktion unterschiedlich strukturiert zu sein. In dieser Hinsicht ist das unit membrane-Konzept zu starr und müßte im Sinne eines dynamischen Geschehens in der Zelle jeweils erheblich modifiziert werden.

## Zusammenfassung

In dem vorbereitenden Teil der Arbeit wurden zunächst die Voraussetzungen für die allgemeine Anwendbarkeit des Gefrierätzverfahrens auf Organismen der verschiedensten systematischen Stellung geschaffen. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Zellen und Geweben systematischen Gefrierschutzuntersuchungen unterzogen. Dabei ließ sich zeigen, daß der Frostschutz eines Objektes in der Hauptsache von vier Faktoren bestimmt wird:

1. natürliche Umwelt der Organismen (primär osmotische Toleranz und primäre Wachstumstemperatur der Zellen),
2. physiologischer Zustand der Zellen,
3. Differenzierungsgrad der Gewebe,
4. Vorliegen der Organismen als Einzelzellen oder als Gewebe

Für Einzelzellen erwiesen sich komplexe Gefrierschutzmittel mit polymerem Anteil als optimal, während für pflanzliche Gewebekulturen, die als kompakte Gewebe vorliegen, Glycerin in Verbindung mit Kokosnußmilch den besten Gefrierschutz ergab.

Das Ziel der Arbeit war der systematische Vergleich von Membransystemen in latent lebenden Zellen von Organismen unterschiedlicher Differenzierungsstufe.

Dabei konnte nachgewiesen werden, daß in der Ultrastruktur des photosynthetischen Apparates von den Dinoflagellaten bis zu den höheren Pflanzen die Tendenz zur Granabildung zunimmt. Dagegen ergab sich auf makromolekularem Niveau erstaunlicherweise ein recht einheitliches Bild der Thylakoidmembran, da mit Ausnahme der Dinoflagellaten, die aus technischen Gründen nicht eindeutig analysiert werden konnten, das Bauprinzip der Thylakoidmembran von den Euglenen bis zu den höheren Pflanzen weitgehend übereinstimmte:

> eine Trägermembran, auf deren Außenseite in den Stapeln oder Grana in lockerer Verteilung große Partikel ( Durchmesser : 160-180 Å) und auf der Innenseite kleine Partikel (Durchmesser: 90-110 Å) in dichter Anordnung lokalisiert waren.

Nach Bleichung von Chlorellazellen konnte eine Destruktion des Thylakoidsystems zu konzentrischen Membranen, verbunden mit einem Partikelschwund beobachtet werden.

Die partikellose Thylakoidmembran zeigte eine fibrilläre, wabenartige Strukturierung. Die Befunde über die makromolekulare Architektur der Thylakoidmembran wurden in einem Modell zusammengefaßt.

Im Gegensatz zur Thylakoidmembran konnten in der Feinstruktur der Kernmembran bei Organismen verschiedener systematischer Kategorie signifikante Unterschiede festgestellt werden.

So waren bei Dinoflagellaten die Kernporen in Gruppen hexagonal auf der Kernhülle angeordnet. Auch bei Euglenen ließ sich das hexagonale Ordnungsprinzip noch rekonstruieren, obwohl die Abstände zwischen den Poren einer Gruppe vergrößert waren. Auch die Kernpore selbst zeigte bei diesen beiden Organismen eine hexagonale Symmetrie. Hingegen konnte bei allen höher entwickelten Organismen mit Hilfe der Gefrierätzung weder eine Symmetrie der Pore noch eine symmetrische Beziehung in der Anordnung der Poren auf der Kernoberfläche nachgewiesen werden. Diese systematischen Beziehungen wurden in einer Schemazeichnung veranschaulicht.

Auch in der Feinstruktur der Cytoplasmamembran ergaben sich auffällige Unterschiede zwischen verschiedenen Organismengruppen. Zwei Typen von Cytoplasmamembranen ließen sich unterscheiden. Während bei der einen Gruppe von Organismen (Chlorella, Penicillium und Schizosaccharomyces ) die Cytoplasmamembran stets charakteristische Invaginationen aufwies, erschien sie bei allen anderen untersuchten Organismen ohne diese auffällige Strukturierung. Der Formenwechsel der Invaginationen auf der Cytoplasmamembran bei Chlorellazellen führte zu der Vermutung, daß ein Zusammenhang zwischen Invaginationen und Bläschentransport besteht. Außerdem konnte in einigen Fällen ein Partikelbesatz der Cytoplasmamembran beobachtet werden.

Die Struktur des Golgi-Apparates war bei den untersuchten Organismen ähnlich, abgesehen von Euglena mit einer auffallend hohen Zahl von Zisternen.

Mit Bläschen gefüllte Säckchen (Multivesicular Bodies ) fanden sich sowohl bei Euglenen als auch bei höheren Pflanzen und menschlichen FL-Zellen.

Die Untersuchungen an latent lebenden Zellen haben gezeigt, daß hinsichtlich der Ultrastruktur der verschiedenen Membranen beträchtliche Unterschiede bestehen, so daß das unit-membrane-Konzept jeweils im Sinne eines dynamischen Geschehens erheblich modifiziert werden müßte.

## Literaturverzeichnis

ABRAM, D. and H. KOFFLER:
In vitro formation of flagellalike filaments and other structures from flagellin.
J. Mol. Biol. 9, 168, 1964

AFZELIUS, B.A.:
The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope
Exptl. Cell Res. 8, 147, 1955

-------:
The nucleus of Noctiluca scintillans Aspects of nucleocytoplasmic exchanges and the formation of nuclear membrane
J. Cell Biol. 19, 229, 1963

-------: Anatomy of the Cell
The University of Chicago Press, 1966

AMELUNXEN, F.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Drüsenhaaren von Mentha piperita L.
Planta med. 12, 12, 1964

ANTEUNIS, A., N. FAUTREZ-FIRLEFIN, J. FAUTREZ et A. LAGASSE:
L'ultrastructure du noyau vitellin de l'oeuf d'Artemia salina
Exptl. Cell Res. 35, 239, 1964

ARNON, D.J.:
The chloroplast as a complete photosynthetic unit
Science 122, 9, 1955

BAHR, G.F., and W. BEERMANN:
The fine structure of the nuclear membrane in the larval salivary gland and midgut of Chironomus
Exptl. Cell Res. 6, 519, 1954

BAIRATI, A. und F.E. LEHMANN:
Über die submikroskopische Struktur der Kernmembran bei Amoeba proteus
Experientia 8, 60, 1952

BALINSKY, B.I., and R.J. DEVIS:
Origin and differentiation of cytoplasmic structures in the oocytes of Xenopus laevis
Acta Embryol et Morphol. Exp. 6, 55, 1963

BALTUS, E., and J. BRACHET:
Presence of DNA in the chloroplasts of Acetabularia mediterranea
Biophys. Biochem. Acta 78, 490, 1963

BAMBERGER, E.S., and R.B. PARK:
Effect of hydrolytic enzymes on the photosynthetic efficiency and morphology of chloroplasts
Plant Physiol. 41, 1591, 1966

BANGHAM, A.D., and R.W. HORNE:
Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope
J. Mol. Biol. 8, 660, 1964

BARNES, B.G., and J.M. DAVIS:
The structure of nuclear pores in mammalian tissues
J. Ultrastruct. Res. 3, 131, 1959

BAUER, H.:
Die Wirkung verschiedener Gefrierschutzmittel auf die lebende Zelle
Diplomarbeit der ETH Zürich, unveröffentlicht
zitiert bei MOOR, H.: Gefrierätzung ( Balzers)

BAUER, H.: Ultrastruktur und Zellwandbildung bei Acanthamoeba spec.
Thesis, ETH, 1967

BAYER, M., and D. PETERS:
" Plexigum" , ein neues Einbettungsmittel für die Elektronenmikroskopie
J. Ultrastruct. Res. 2 , 444, 1959

BEAMS, H.W., T.N. TAHMISIAN, R.L. DEVINE, and E.ANDERSON:
Ultrastructur of the nuclear membrane of an gregarine parasitic in grashoppers
Exptl. Cell Res. 13, 200, 1957

BEHNKE, O.:
Demonstration of acid phosphatase containing granules and cytoplasmic bodies in the epithelium of foetal rat duodenum during certain stages of differentiation
J. Cell Biol. 18 , 151, 1963

BELL, P.R., and K. MÜHLETHALER:
The degeneration and reappearance of mitochondria in the egg cells of a plant
J.Cell Biol. 20 , 235, 1964

BENDA, C.:
Über die Entstehung der Spiralfaser des Verbindungsstückes der Säugetierspermien
Anat. Anz. Ergh. 14 , 264, 1898

BENEDETTI, E. L., and P. EMMELOT:
Electron microscopic observations on negatively staines plasma membranes isolated from rat liver
J. Cell Biol. 26, 299, 1965

--- ---:
On the fine structure of cellular membranes
6. Intern. Congr. Electron Microscopy
Kyoto, Japan, 1966, p. 399

BENSON ; A. A.:
Plant membrane lipids
Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 1, 1964

BERNHARD, W., A. BAUER, M. GUERIN et C. OBERLING:
Etude au microscope electronique de corpuscules d'aspect dans les epitheliomas mammaires de la souris
Bull. Cancer 13, 163 , 1955

BIEBL, R.:
Protoplasmatische Ökologie
Naturw. Rdsch. 2o , 248, 1967

BINGGELI, M. F.:
Abnormal intranuclear and Cytoplasmic formations associated with a chemically induced, transplantable chicken sarcoma
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5 , 143, 1959

BISALPUTRA, T., and A. BISALPUTRA:
The occurence of DNA fibrils in chloroplasts of Laurencia spectabilis
J. Ultrastruct. Res. 17 , 571, 1967

BISCHOFF, A., and H. MOOR:
The ultrastructure of the "difference factor" in the myelin
Z. Zellforsch. 81 , 571, 1967

BRANTON, D.:
Fracture faces of frozen membranes
Proc. Nat. Acad. Sc. 55 , 1o45, 1966

--- , and H. MOOR: Fine structure in freeze etched Allium cepa L. root tips
J. Ultrastruct. Res. 11 , 4O1, 1964

----, and R. B. PARK: Subunits in chloroplast lamellae
J. Ultrastruct. Res. 19 , 283, 1967

BRAWERMAN, G., and J.M. EISENSTADT:
Template and ribosomal ribonucleic acids associated with chloroplasts and the cytoplasm of Euglena gracilis
J. Mol. Biol. 10, 403, 1964

BRICKA, M., and M. BESSIS:
Sur la conservation des erythrocytes par congelation á basse temperature en présence de polyvinyl-pyrrolidone et de dextran
C.R.Soc. Biol., Paris 149, 875, 1955

BUDD, G.C., and G.M. MILLS:
Labelled cytoplasmic organelles in Allium cepa Var. "White Lisbon"after administration of tritiated thymidine
Nature 205, 525, 1965

BULLIVANT, S., and J. HOTCHIN:
Chromyl chloride, a new stain for electron microscopy
Exptl. Cell Res. 21, 211, 1960

BUVAT, R.:
Nouvelles observations sur l'appareil de Golgi dans les cellules des vegetaux vasculaires
C.R. Acad. Sc. Paris 246, 2157, 1958a

-----: Recherches sur les infrastructures de cytoplasme, dans les cellules de meristeme apical, des ebauches foliaires et des feuilles developpees d'Elodea canadensis
Ann.Sc.Nat.Bot.19. 121, 1958b

CALLAN, H.G., and TOMLIN, S.G.:
Experimental studies on amphibian oocyte nuclei
I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope
Proc. Roy. Soc. Ser. B 137, 367, 1950

CALVIN, M.:
From microstructure to macrostructure and function in the photochemical apparatus
Brookh. Symp. Biol. 11, 160, 1959

- - - - -: The path of carbon in photosynthesis
Science 135, 879, 1962

CAMEFORT, H.:
L'organisation du protoplasme dans le gamète femelle, ou oosphere du Gingko biloba L.
J. Microscopie 4, 531, 1965

CHAMBERS, R., and B. FELL:
Micro-operations on cells in tissue cultures
Proc. Roy. Soc. Ser. B 109, 380, 1931

CHANCE, B., R.W. ESTABROOK, and C.-P. LEE:
Electron transport in the oxysome
Science 140, 379, 1963

CHATTERJEE, S.K., H.K.DAS, and S.C. ROY:
DNA and the synthesis of protein in plant mitochondria
Biochim. Biophy. Acta 114, 349, 1966

COHEN-BAZIRE, G., and R. KUNISAWA:
The fine structure of Rhodospirillum rubrum
J.Cell Biol. 16, 401, 1964

-------, and W.R. SISTROM:
The procaryotic photosynthetic apparatus
in : The Chlorophylls ( ed. L.P. VERNON and G.R. SEELY)
Acad. Press New York and London, 1966, p.313

COLLANDER, R.:
Über die Kationenelektion der höheren Pflanzen
Ber.dtsch.Bot.Ges. 55 , 74, 1937

CUNNINGHAM, W.P., D.J. MORRÉ, and H.H. MOLLENHAUER:
Structure of isolated plant Golgi-apparatus revealed by negative staining
J. Cell Biol. 28 , 169, 1966

DANEEL, S. und N. WEISSENFELS:
Besseres Fixierungsverfahren zur Darstellung des Grundplasmas von Protozoen und Vertebratenzellen
Mikroskopie 20, 89, 1965

DANIELLI, J.F., and H.A. DAVSON:
A contribution to the theory of permeability of thin films
J.Cell. comp. Physiol. 5 , 495, 1934

-----, and E.N. HARVEY:
The tension of the surface of mackerel egg oil, with remarks on the nature of the cell surface
J.Cell. comp. Physiol. 5 , 483, 1935

DALCQU, A.M.:
The relation to lysosomes of the in vivo metachromatic granules
in: Lysosomes ( ed. RENK and CAMERON)
J.A.Churchill, Ltd., London, 1963, p. 226

DAVENPORT, H.E.:
Cytochrome components in chloroplasts
Nature, 170, 1112, 1952

DIERS, L.:
Bilden sich während der Oogenese bei Moosen und Farnen die Mitochondrien aus dem Kern?
Ber. dtsch. Bot. Ges. 77, 369, 1964

DODGE, J.D.:
Chromosome structure in the Dinoflagellates and the problem of the mesocaryotic cell
2. Intern. Conf. Protozool. Ser. 91, Nr. 339, 1965

DOURMASHKIN, R.R., R.M. DOUGHERTY and R.J.C. HARRIS:
Electron microscopic observations on Rous-Sarcoma-Virus and cell membranes
Nature, 194, 1116, 1962

DRAWERT, H. und I. METZNER-KÜSTER:
Fluoreszenz-und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Beggiatoa alba und Thiothrix nivea
IV. Mitteilung der Reihe : Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen
Arch. Mikrobiol. 31, 422, 1958

-----, und M. MIX:
Zur Frage von Struktur und Funktion des "Golgi-Apparates" in Pflanzenzellen
Sitz. ber. Ges. Beförd. ges. Naturwissenschaften Marburg 83/84, 361, 1961/62

DREWS, G. und P. GIESBRECHT:
Zur Morphogenese der Bakterien- "Chromatophoren" (-Thylakoide) und zur Synthese des Bakteriochlorophylls bei Rhodopseudomonas spheroides und Rhodospirillum rubrum
Zbl. Bakt. I. Orig. 190, 508, 1963

---------, --------: Die Thylakoidstrukturen von Rhodopseudomonas spec.
Arch. Mikrobiol. 52, 242, 1965

----- ---, --------: Der Aufbau der Bakterien- und Cyanophyceenzelle
in : Die Zelle ( ed. H. METZNER)
Wissensch. Verlagsges. Stuttgart 1966, p. 57

DUVE, C. DE: Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles
in : Subcellular particles ( ed. T. HAYASHI )
The Ronald Press New York 1959, p. 128

--------: The lysosome concept
in: Lysosomes ( ed. RENK und CAMERON )
J.A. Churchill Ltd., London 1963

ECHLIN, P., H. GODWIN, B. CHAPMAN and R. ANGOLD:
The fine structure of polyvesicular bodies associated with cell walls in the developing anthers of Ipomoea purpurea
6. Intern. Congr. f. Electr. Microsc. Kyoto, Japan 1966, p. 317

EISENSTADT, J., and G. BRAWERMAN:
The incorporation of amino acids into the protein of chloroplasts and chloroplast ribosomes of Euglena gracilis
Biochim. Biophys. Acta, 76, 319, 1963

ELBERS, P.F.:
The cell membranes : image and interpretation
Recent Progress in Surface Science 2, 443, 1964

ERLANDSON, R.A.:
A new Maraglas, D.E.R. 732, embedment for electron microscopy
J. Cell Biol. 22, 704, 1964

FELDHERR, C.M.:
The nuclear annuli as pathways for nucleo cytoplasmic exchanges
J. Cell Biol. 14, 65, 1962

-------:
Nucleo cytoplasmic exchanges during cell division
J. Cell Biol. 31, 199, 1966

FERNANDEZ-MORAN, H.:
Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid Helium II
Ann. N.Y. Acad. Sci. 85, 689, 1960

-------:
Subunit organization of mitochondrial membranes
Science 140, 381, 1963

-------:, T. ODA, P.V. BLAIR, and D.E. GREEN:
A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function
J. Cell. Biol. 22, 63, 1964

FLEISCHER, S., B. FLEISCHER, and W. STOECKENIUS:
Fine structure of lipid-depleted mitochondria
J. Cell Biol. 32, 193, 1967

FREY-WYSSLING, A.:
Der Aufbau der Chlorophyllkörner
Protoplasma 29, 279, 1938

-------:
Submicroscopic morphology of protoplasm
Elsevier, Amsterdam 1953

-------:
Macromolecules in cell structure
Harvard University Press, Cambridge 1957

-------:, J.F. LOPEZ-SAEZ, and K. MÜHLETHALER:
Formation and development of the cell plate
J. Ultrastruct. Res. 10, 422, 1964

-------:, and K. MÜHLETHALER:
Ultrastructural plant cytology
Elsevier, Amsterdam, London, New York 1965

-----, -----, and R. WYCKOFF:
Mikrofibrillenbau der pflanzlichen Zellwände
Experientia 4, 475, 1947

FUCHS, V.:
Elektronenmikroskopische Beobachtungen multivesikulärer Körper in Endothel - und Skelettmuskelzellen
Z. mikr. - anat. Forsch. 70, 391, 1963

GALL, J.G.:
Observations on the nuclear membrane with the electron microscope
Exptl. Cell Res. 7, 197, 1954

-----:
Octogonal nuclear pores
J. Cell Biol. 32, 391, 1967

GANTT, E., and S.F. CONTI:
The ultrastructure of Porphyridium cruentum
J. Cell Biol. 26, 365, 1965

GAUTHERET, R.J.:
Physiologie végétale nouvelles recherches sur la néoformation de racines par des tissues de Topinambour cultivés in vitro
C.R. Acad. Sc. Paris 253, 1514, 1961

GAY, H.:
Chromosome-nuclear membrane-cytoplasmic interrelations in Drosophila
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 407, 1956

GELLER, D.M.:
Oxidative phosphorylation in extracts of Rhodospirillum rubrum
J. Biol. Chem. 237, 2947, 1962

GIBBS, S.P.:
The ultrastructure of the chloroplasts of Algae
J. Ultrastruct. Res. 7, 419, 1962

-------,: W.R.SISTROM, and P.B. WORDEN:
The photosynthetic apparatus of Rhodospirillum molischianum
J.Cell Biol. 26, 395, 1965

GIBSON, K.D.:
Structure of chromatophores of Rhodopseudomonas spheroides.
Removal of a nonpigmented outer layer of lipid
Biochemistry 4, 2052, 1965

GIESBRECHT, P:
Über die Tertiärstruktur der DNS in den Chromosomen lebender Zellen
Z. Naturforschg. 20b, 927, 1965

GIESBRECHT, P.:
Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Zytologie
und molekularen Morphologie prokaryotischer und eukaryotischer Zellen
Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin, 1966

-------: Zur Darstellung der DNS von Bakterien und plastischer biologischer
Strukturen mit Hilfe der Gefrierätzung
Zbl. Bakt. 207, 1968 ( im Druck)

------- und G. DREWS:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der
" Chromatophoren" von Rhodospirillum molischianum Giesberger
Arch. Mikrobiol. 43, 152, 1962

------- , --------: Über die Organisation und die makromole-
kulare Architektur der Thylakoide "lebender " Bakterien
Arch. Mikrobiol. 54, 297, 1966

GIFFORD, E.M. and K.D. STEWART:
Ultrastructure of the shoot apex of Chenopodium album and certain
other seed plants
J.Cell Biol. 33, 131, 1967

GLAUERT, A.M., and R.H. GLAUERT:
Araldite as an embedding medium for electron microscopy
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 191, 1958

GOEDHERR, J.C.:
Orientation of the pigment molecules in the chloroplast
Biochim. Biophys. Acta 16, 471, 1955

GÖRING, H.:
Der Membrantransport der Saccharose als ein progressiver Schritt in der Evolution der Pflanzen
Flora Abt. A 157, 318, 1966

GOLGI, C.:
Sur la structure des cellules nerveuses
Arch. Ital. Biol. 30, 60, 1898

GORTHER, E. und F. GRENDEL:
On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood
J. exp. Med. 41, 439, 1925

GREENHAM, C.G.:
The relative electrical resistances of the plasmalemma and tonoplast in higher plants
Planta 69, 150, 1966

GREENWOOD, A.D.:
Structure of chloroplasts in lower plants
X. Intern. Bot. Congr., Edinburgh 1964

-----, R.M. LEECH, and J.P. WILLIAMS:
The osmiophilic globules of chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 78, 148, 1963

GRELL, K.G und K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN:
Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Dinoflagellate Amphidinium elegans n sp.
Z. Zellforsch. 47, 7, 1957

GRILLO, M.A., and S.L. PALAY:
Granule-containing vesicles in the autonomic nervous system
5. Intern. Congr. Electron Microsc. Philadelphia 1962, U-1

GUSEK, W.:
Zur ultramikroskopischen Cytologie der Belegzellen in der Magenschleimhaut des Menschen
Z. Zellforsch. 55, 790, 1961

HALL, W.T., and G. CLAUS:
Ultrastructural studies on the blue-green algal symbiont in Cyanophora paradoxa Korschikoff
J. Cell Biol. 19, 551, 1963

HALPERIN, W., and W.A. JENSEN:
Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures
J. Ultrastruct. Res. 18, 426, 1967

HARRIS, P.:
Electron microscope study of mitosis in sea urchin blastomeres
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 419, 1961

HEBER, U.:
Proteinsynthesis in chloroplasts during photosynthesis
Nature 195, 91, 1962

HEITZ, E.:
Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten
Ber.dtsch. Bot. Ges. 54, 362, 1936

------:
Das lamellare Dünn-Dick-Muster der Chloroplasten in Euglena, Fucus und Vaucheria
Z. Zellforsch. 53, 444, 1961

HELLER, R.:
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro
Ann. Sci. Nat. 14, 1, 1953

HENDLER, R.W.:
A model for protein synthesis
Nature 193, 821, 1962

HENNEBERG, G. und H. KÜHLER:
Praktikum der Virusdiagnostik
Fischer Verlag Stuttgart 1961

HESLOP-HARRISON, J.:
Structure and morphogenesis of lamellar systems in grana-containing chloroplasts.
I. Membrane structure and lamellae architecture
Planta 60, 243, 1963

HICKMAN, D.D., and A.W. FRENKEL:
Observations on the structure of Rhodospirillum molischianum
J. Cell Biol. 25, 261, 1965

HIRSCH, G.C.:
Form-und Stoffwechsel der Golgikörper
Protoplasma-Monographien 18
Gebr. Borntraeger, Berlin 1939

HODGE, A.J.:
Fine structure of lamellae systems as illustrated by chloroplasts
Rev. Modern Physics 31 , 331, 1959

------, J.D. Mc LEAN, and F.V. MERCER:
Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of Zea mays L. Portug.
J. Biophys. Biochem. Cytol 1 , 605, 1955

HOFFMANN, P. und U. KARSTEN:
Zur Frage der Chlorophyllbildung in pflanzlichen Tumoren
Planta 69 , 96, 1966

HOGEBOOM, G.H., W.C. SCHNEIDER, and G.E. PALADE:
The isolation of morphologically intact mitochondria from rat liver
Proc.Soc.Exptl. Biol. Med. New York 65, 320, 1947

HOHL, H.R. and A. HEPTON:
A globular subunit pattern in plastid membranes
J. Ultrastruct. Res. 12 , 542, 1965

HOLLMANN, K.H.:
L'ultrastructure de la glande mammaire normale de la souris en lactation
J. Ultrastruct. Res. 2 , 423, 1959

HOLT, S.C., and A.G. MARR:
Isolation and purication of the intracytoplasmic membranes of Rhodospirillum rubrum
J. Bacteriol 89 , 1413, 1965

HOSEMANN, R. , and W. KREUTZ:
On the tertiary structure of the protein layers of chloroplasts
Naturwissenschaften 53 , 298, 1966

HOWELL, S.H., and E.N. MOUDRIANAKIS:
Hill reaction site in chloroplast membranes: Non-participation of the quantasome particle in photoreduction
J. Mol. Bio. 27 , 323, 1967

HUANG, C., J. WHEELDON, and T.E. THOMPSON:
The properties of lipid bilayer membranes separating two aqueous phases: formation of a membrane of simple composition
J.Mol. Biol. 8 , 148, 1964

HYDE, B.B., A.J. HODGE, A. KAHN, and M.L. BIRNSTIEL:
Studies en phytoferritin.
I. Identification and localization
J. Ultrastruct. Res. 9 , 248, 1963

IZAWA, S., and N.E. GOOD:
The number of sites sensitive to 3-(3,4-diechlorphenyl) -1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl ) -1,1-dimethylurea and 2-chloro-4- (2-propylamino)-6-ethylamino-s-Triamine in isolated chloroplasts
Biochim. Biophy. Acta 102, 20, 1965

IZQUIERDO, L., and J.D. VIAL:
Electron microscope observations on the early development of the rat
Z. Zellforsch. 56 , 157, 1962

INGEN-HOUSZ, I.:
Experiments upon vegetables, discovering their great power of pyrifying the common air in the sunshine
London, 1779 (zitiert bei FREY-WYSSLING, A., and K. MÜHLETHALER, 1965)

JAGENDORF, A.T., and D.M. BONNER:
An atypical growth of cabbage seedling roots
Plant Physiol. 28 , 415, 1953

JENSEN, W.A.:
The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton
Am. J. Bot. 52, 238, 1965

JOST, M.:
Die Ultrastruktur von Oscillatoria rubescens D.C.
Arch. Mikrobiol. 50 , 211, 1965

KAJA, H.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der Chloroplasten einiger niederer Pflanzen
Forsch.ber. d. Landes Nordrhein-Westfalen Nr. 1610, 1-52, 1966

KAVANAU, J.L.:
Structure and functions of biological membranes
Nature 198 , 525, 1963

KESSEL, R.G.:
Intranuclear and cytoplasmic annulate lamellae in tunicate oocytes
J. Cell. Biol. 24 , 471, 1965

KING, R.C., and R.L. DEVINE:
Oogenesis in adult Drosophila melanogaster
Growth 22 , 299, 1958

KORN, E.D.:
Structure of biological membranes
Science 153, 1491, 1966

KRATKY, D., W. MENKE, A. SEKORA, B. PALETTA, and M. BISCHOF:
Orientierende Röntgenkleinwinkelmessungen an Chloroplasten von Allium porum
Z. Naturforsch. 14b, 307, 1959

KREUTZ, W.:
Strukturuntersuchungen an Plastiden IV. Über das zweidimensionale Gitter in der Proteinlamelle
Z. Naturforsch. 18b, 567, 1963

-------:
Teil der Habilitationsschrift
Technische Universität Berlin, 1968, S.59-77

------- und W. MENKE:
Strukturuntersuchungen an Plastiden
Z. Naturforsch. 17b, 675, 1962

KUSHIDA, H.:
A new embedding method for ultrathin sectioning using a methacrylate resin with threedimensional polymer structure
J. Electronmicr. 10, 194, 1961

-------: New embedding with D.E.R. 736 and Epon 812
6. Intern. Congr. Electron Microsc.
Kyoto, Japan, 1966 p.33

LANCE, A.:
Sur l'infrastructure des cellules apicales de Chrysanthemum segetum
C.R. Acad. Sci. Paris 245, 352, 1957

-------: Infrastructure des cellules du meristéme apical et des jeunes ébauches foliaires de Chrysanthemum segetum L.
Ann. Sci. Nat. Bot. 19, 165, 1958

LANG, N.J.:
Electron microscopy of the Volvocaceae and Astrephomenaceae
Am. J. Bot. 50, 290, 1963

LANGE, R.:
Zur Histologie und Cytologie der Glandula parathyreoidea des Menschen
Z. Zellforsch. 53, 765, 1961

LAWN, A.M.:
Observations on the fine structure of gastric parietal cell of the rat
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 161, 1960

LEADBEATER, B., and J.D. DODGE:
An electron microscope study of nuclear and cell division in a Dinoflagellate
Arch. Mikrobiol. 57, 239, 1967

LEEDALE, G.F., B.J.D. MEEUSE, and E.G. PRINGSHEIM:
Structure and physiology of Euglena spirogyra
Arch. Mikrobiol. 50, 68, 1965

LEFORT, M.:
Nouvelles recherches sur l'infrastructure du chromatoplasma des Cyanophycèes
C.R.Acad. Sci. Paris 251, 3046, 1960

LEHNINGER, A.L.:
Supramolecular organization of enzyme and membrane systems
Naturwissenschaften 53, 57, 1966

LEVITT, J.:
Winter hardiness in plants
in: Cryobiology ( ed. H.T.MERYMAN)
Acad. Press, 1966, p.495

LEYON, H.:
The structure of chloroplasts.
The development an structure of the Aspidistra chloroplasts
Exptl. Cell Res. 7, 265, 1954

LICHTENTHALER, H.K. und B. SPREY:
Über die osmiophilen Lipideinschlüsse der Chloroplasten
Z.Naturforsch. 21b, 690, 1966

LIMA DE FARIA, A., and M.J.MOSES:
Labeling of Zea mays chloroplast with $H^3$-Thymidine
Hereditas 52, 367, 1965

LOVELOCK, J.E.:
Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing
Biochim.Biophys.Acta 11, 28, 1953

-------, and M.W.H. BISHOP: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide
Nature 183, 1394, 1959

LÖW, H. , and B.A. AFZELIUS:
Subunits of the chromatophore membranes in Rhodospirillum rubrum
Exptl. Cell Res. 35, 431, 1964

LUNDEGÅRDH, H.:
Response of chloroplast cytochromes to light and substates
Nature 192 , 243, 1961

LUCK, D.J.L.:
The biogenesis of mitochondria in Neurospora, a summary of present findings
in: Funktion und morphologische Organisation der Zelle ( ed. P. SITTE) S. 314 , 196

LUFT, J.H.:
Permanganate - a new fixative for electron microscopy
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2 , 799, 1956

------: Improvements in epoxy resin embedding methods
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 , 409, 1961

LUZZATI, V., and F. HUSSON:
The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems
J.Cell. Biol. 12 , 207, 1962

MAHOWALD, D.P.:
Fine structure of pole cells and polar granules in Drosophila melanogaster
J. Exptl. Zool. 151 , 201, 1962

MANTON, I.:
Observation with the electron microscope on Synura caroliniana
Proc. Leeds Phil. Soc. 6 , 306, 1955

MARINOS, N.G.:
Vacuolation in plant cells
J. Ultrastruct. Res. 9 , 177, 1963

MATILE, P., H. MOOR, and K. MÜHLETHALER:
Isolation and properties of the plasmalemma in Yeast
Arch. Mikrobiol. 58 , 201, 1967

MAZUR, P.:
Physical factors implicated in the death of microorganism at subzero temperatures
Ann. New York. Acad. Sci. 85 , 610, 1960

MC LEAN, J.R., G.L. COHN, I.K. BRANDT, and M.V. SIMPSON:
Incorporation of labeled amino acids into the protein of muscle and liver mitochondria
J. Biol. Chem. 233, 657, 1958

MC ALEAR, J.H., and G.A. EDWARDS:
Continuity of plasma membrane and nuclear membrane
Exptl. Cell Res. 16, 689, 1959

MENGEL, K.:
Stofftransport durch Zellgrenzflächen
in: Die Zelle ( ed. H. METZNER)
Wissenschaftl. Verlagsges. Stuttgart S. 281, 1966

MENKE, W.:
Chloroplasten-Studien
Protoplasma 21, 279, 1934

------: Über den Feinbau der Chloroplasten
Kolloid.-Z. 85, 256, 1938

------: Über das Lamellarsystem des Chromatoplasmas von Cyanophyceen
Z. Naturforsch. 16b, 543, 1961

------: Feinbau und Entwicklung der Plastiden
Ber. dtsch. Bot. Ges. 77, 34O, 1965

------: The molecular structure of photosynthetic lamellar systems
Brookh. Symp. Biol. 19, 328, 1966

------ und G. MENKE: Wasser und Lipide in Chloroplasten
Protoplasma 66, 535, 1956

------und C. WEICHAN: Über die Struktur der Thylakoide von
Rhodopseudomonas spheroides
Arch. Mikrobiol. 6O, 1, 1968

MERCER, E.H.:
The evolution of intracellular phospholipid membrane systems
in: Symp. Intern. Soc. Cell Biol.
The interpretation of ultrastructure
( ed. R.J.C. HARRIS) 1962, p. 369

MERKER, H.J.:
Über das Vorkommen multivesikulärer Einschlußkörper
(" multivesicular bodies " ) im Vaginalepithel der Ratte
Z. Zellforsch. 68, 618, 1965

MERYMANN, H.T.:
Review of biological freezing
in: Cryobiology ( ed. H.T. MERYMAN)
Acad. Press. New York and London 1966, p.1

------, E. KAFIG, and M. HORNB LOWER:
Presented at IX. Congr. of int. Soc. Blood Trans., Mexico
City, 1962. zitiert bei: H.T. MERYMAN: Cryobiology
Acad. Press. 1966, p.1

MEYER, A.: Das Chlorophyllkorn
A. Felix, Leipzig, 1883

MICHEL-WOLWERTZ, M.R., and C.SIRONVAL:
On the chlorophylls separated by paper chromatography from Chlorella extracts
Biochim.Biophy.Acta 94, 330, 1965

MILLER, F.:
Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenoptischen Bild
Verh.Dtsch.Ges. Path. 42, 261, 1959

MOE, H., J.ROSTGAARD, and O.BEHNKE:
On the morphology and origin of virgin lysosomes in the intestinal epithelium of the rat
J. Ultrastruct. Res. 12, 396, 1965

MOLLENHAUER, H.H.:
Transition forms of Golgi apparatus secretion vesicles
J.Ultrastruct. Res. 12, 439, 1965

-------, and D.J.MORRÉ: Golgi apparatus and plant secretion
Ann. Rev. Plant. Physiol.17, 27, 1966

-------, W.G. WHALEY, and J.H. LEECH:
A function of the Golgi apparatus in outer root cap cells
J.Ultrastruct. Res. 5, 193, 1961

MOOR, H.:
Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie
Z.Zellforsch. 62, 546, 1964

-------: Die Gefrierätz-Technik
13.Tagung Dtsch.Ges. f.Elektronenmikroskopie
Marburg A-1, 1967 a

MOOR, H.:
Durchführung der Gefrierätzung und Interpretation der Resultate betreffend Oberflächenstrukturen von Membranen und Feinbau von Mikrotubuli und Spindelfasern
Balzers Fachbericht 9, 1967 b

-------, and K.MÜHLETHALER: Fine structure in frozenetched yeast cells
J.Cell Biol. 609, 1963

-------, C.RUSKA und H.RUSKA:Elektronenmikroskopische Darstellung tierischer Zellen mit der Gefrierätztechnik
Z.Zellforsch. 581, 1964

MÜHLETHALER, K.:
Die Struktur der Grana- und Stromalamellen in Chloroplasten
Z. wiss. Mikr. 64, 444, 1960a

-------: Die Feinstruktur der Zellulosemikrofibrillen
Beih. Z. Schweiz. Forstvereins 30, 55, 1960b

-------, H. MOOR, and. J.W. SZARKOWSKI:
The ultrastructure of the chloroplast lamellae
Planta 67, 305, 1965

MURAKAMI, S:
Microstructure of chloroplast lamellae
J. Electronmicrosc. 13, 234, 1964

-------: Microstructure of spinach chloroplast lamellae as revealed by aceton extraction
6. Intern. Congr. Electr. Microsc.
Kyoto, Japan, 1966 p. 371

-------, S. KATHOH, and A. TAKAMIYA:
Lamellar structure in chloroplasts and its function
in: Intracellular membraneous structure
(ed. S. SONO, and E.V. COWDRY) 1965, p. 173

NASH, T.:
Prevention of freezing damage to living cells by pyridine N-oxyde
Nature 192, 360, 1961

-------: The chemical constitution of compounds which protect erythrocytes against freezing damage
J. Gen. Physiol. 46, 167, 1962

-------: Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing
in: Cryobiology (ed. H.T. MERYMAN)
Acad. Press, 1966 p. 179

NASS, M.M.K., and S. NASS:
Intramitochondrial fibers with DNA characteristics
I. Fixation and electron staining reactions
J. Cell Biol. 19, 593, 1963

NIKLOWITZ, W. und G. DREWS:
Beiträge zur Cytologie der Blaualgen
Arch. Mikrobiol. 24, 134, 1956

NOVIKOFF, A.B.: Mitochondria
in: The Cell ( ed. J. BRACHET, and H.E. MIRSKY) Vol II. 1961, p.299
Acad. Press New York and London 1961

-------, and W.Y. SHIN:
The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells
J. Microscopie 3 , 187, 1964

-------, E. ESSNER et N. QUINTANA:
The Golgi apparatus and lysosomes
Fed. Proc. 1964
zitiert bei NOVIKOFF und SHIN, 1964

ODA, T., and H. HUZISIGE:
Macromolecular repeating particles in the chloroplast membrane
Exptl. Cell Res. 37 , 481, 1965

-------, and S. SEKI: Molecular organization of the energy transducing system in the mitochondrial membrane
6. Intern. Congr. Electron Microsc.
Kyoto, Japan, 1966 p.369

----, ----and H. HAYASHI:
Analytical studies on the molecular structure of the mitochondrial membrane by selective extraction of the components of the electron transfer chain
J. Electron Microscopy 14 , 354, 1965

OLSON, R.A., W.H. JENNINGS, and W.L. BUTLER:
Molecular orientation: spectral dependence of dichroism of chloroplasts in vivo
Biochim. Biophys. Acta 88 , 318, 1964a

-----, ------, -----:
Molecular orientation: spectral dependence of bifluorescence of chloroplasts in vivo
Biochim. Biophys. Acta 88 , 331, 1964 b

PALADE, G.E., P. SIEKEWITZ, and L.G. CARO: Structure chemistry and function of the pancreatic exocrine cell
in: Exocrine Pancreas
Ciba Foundation Symp. London 1962 p 23

PALAY, S.L.:
The fine structures of secretory neurons in the pre optic nucleus of the goldfish
Anat. Rev. 138 , 417, 1960

PALAY, S.L., and G.E. PALADE:
The fine structure of neurons
J. Biophys. Biochem. Cytol 1, 69, 1955

PAPPAS, G.D.:
The fine structure of the nuclear envelope of Amoeba proteus
J. Biophys. Biochem. Cytol 2, Suppl. 431, 1956

PARK, R.B.:
Substructure of chloroplast lamellae
J. Cell Biol. 27, 151, 1965

-------, and J. BIGGINS:
Quantasome: Size and composition
Science 144, 1009, 1964

PARK, R.B. and N.G. PON:
Correlation of structure with function in Spinacea oleracea chloroplasts
J. Mol. Biol. 3, 1, 1961

-----, -----: Chemical composition and the substructure of lamellae isolated from Spinacea oleracea chloroplasts
J. Mol. Biol. 6, 105, 1963

PERNER, E.:
Zum elektronenmikroskopischen Nachweis des Golgi-Apparates" in Zellen höherer Pflanzen
Naturwiss. 44, 336, 1957

-------: Elektronenmikroskopische Befunde über Kristallgitterstrukturen im Stroma isolierter Spinatchloroplasten
Portugal. Acta Biol., Ser. A 6, 359, 1962

PICKETT-HEAPS, J.D.:
Further observations on the Golgi apparatus and its functions in cells of the Wheat seedling
J. Ultrastruct. Res. 18, 287, 1967

PIGON, A.:
On the pellicle of Euglena viridis
Bull. int. Acad. Polon. Sci. B II, 111, 1947

POLGE, C., A.U. SMITH, and A.S. PARKES:
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures
Nature 164, 666, 1949

POLLISTER, A.W., M. GETTNER, and R. WARD:
Nucleocytoplasmic interchange in oocytes
Science 120, 789, 1954

PORTER, K.R., and R.D. MACHADO:
Studies on the endoplasmic reticulum
IV. Its forms and distribution during mitosis in cells of onion root tip
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 167, 1960

PORTERFIELD, J.S., and M.J. ASHWOOD-SMITH:
Preservation of cells in tissue culture by glycerol and dimethyl sulphoxide
Nature 193, 548, 1962

PRINGSHEIM, E.G.:
Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung
Jena 1954

REBHUN, L. J.:
Aster-assoziated particles in the cleavage of marine invertebrate eggs
Ann. New York. Acad. Sci 90, 357, 1960

-----, and G. SANDER:
Freeze-substitution studies of glycerol - impregnated cells
6. Intern. Congr. Electr. Microscopy
Kyoto, Japan, 1966, Vol. II, p. 49

REINERT, J., and P.R. WHITE:
The cultivation in vitro of tumor tissue and normal tissue of Picea glauca
Physiol. Plantarum 9, 177, 1956

RESCH, A. und E. PEVELING:
Carminessigsäure zur Darstellung des Zellkerns im Elektronenmikroskop
Plante 59, 85, 1962

REYNOLDS, E.S.:
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron micrescopy
J. Cell. Biol. 17, 208, 1963

RING, K.:
Der Einfluß der Adaptionstemperatur auf die Kältestabilität der Zellmembran von Streptomyces hydrogenans
Biochim. Biophys. Acta 94, 598, 1965

RIS, H., and W. PLAUT:
Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas
J. Cell. Biol. 13, 383, 1962

----, and R.N.J.SINGH:
Electron microscope studies on blue-green algae
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 63, 1961

ROBBINS, E., and N.K.GONATAS:
The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle
J.Cell Biol. 21 , 429, 1964

-------, P.J.MARCUS, and N.GONATAS:
Dynamics of acridine orange cell interaction
II. Dye-induced ultrastructural changes in multivesicular bodies
J.Cell Biol. 21 , 49, 1964

ROBERTSON, J.:
The ultrastructure of cell membranes and their derivates
Biochem.Soc.Symp. 16 , 3, 1959

-------: The molecular biology of cell membranes
Acad.Press New York and London 1960

ROBINOW, C.F., and A. BAKERSPIEGEL:
Somatic nuclei and forms of mitosis in fungi
in: The Fungi Vol II ( ed.G.C.AINSWORTH and
A.S.SUSSMAN)
Acad.Press New York and London 1965

-------, and J.MARAK: A fibre apparatus in the nucleus of the yeast cell
J.Cell Biol. 29 , 129, 1966

ROSENBLUTH, J. and S.R. WISSIG:
The distribution of exogenous ferritin in toad spinal ganglia and the
mechanism of its uptake by neurons
J.Cell Biol. 23 , 307, 1964

ROTH, L.E., S.W.OBETZ, and E.W. DANIELS:
Electron microscopic studies of mitosis in amoebae
J.Biophys.Biochem.Cytol. 8 , 207, 1960

RUCH, F.:
Ultraviolettdichroismus der Nukleinsäuren und Proteine
in Zellstrukturen
Acta Histochem. 4 , 193, 1957

RUPPEL, H.G. und D. VAN WYK:
Über die Desoxyribonucleinsäure in Chloroplasten
von Antirrhinum majus
Z.Pflanzenphysiol. 53 , 32, 1965

RUSKA, H.
Der Einfluß der Elektronenmikroskopie auf die biologische Forschung
S.B.Ges.Bef.ges.Naturwiss.
Marburg 82 , 3, 1960

RYTER, A., and E. KELLENBERGER:
L'inclusion an polyester pour l'ultramicrotomie
J. Ultrastruct. Res. 2, 200, 1958

SAGER, R., and G. E. PALADE:
Chloroplast structur in green and yellow strains of Chlamydomonas
Exptl. Cell Res. 7, 584, 1954

SAKAI, H.:
Relation of sugar content to frost-hardiness in plants
Nature 185, 698, 1960

SAUER, K., and M. CALVIN:
Molecular orientation in quantasomes
I. Electric dichroism and electric birefringence of quantasomes from spinach chloroplasts
J. Mol. Biol. 4, 451, 1962

SCOTT, F. M.:
Perforation of the surface membrane of nuclei and plastids by nucleodesmata and plastodesmata
Bot. Gaz. 111, 252, 1950

SHIHIRA-ISHIKAWA, I., and E. HASE:
Nutritional control of cell pigmentation in Chlorella protothecoides with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose
Plant Cell Physiol. 5, 227, 1964

SIEVERS, A.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur geotropischen Reaktion
I. Über Besonderheiten im Feinbau der Rhizoide von Chara foetida
Z. Pflanzenphysiol. 53, 193, 1965

-------:
Funktion des Golgi-Apparates in pflanzlichen und tierischen Zellen
in: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle
Vol. II: Sekretion und Exkretion
(ed. K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN)
Springer Verlag, Berlin etc. 1965 b p. 89

SITTE, P.:
Die submikroskopische Organisation der Pflanzenzelle
Ber. dtsch. Bot. Ges. 74, 177, 1961

-------: Bau und Feinbau der Pflanzenzelle
Fischer Verlag Stuttgart 1965

SJÖSTRAND, F.S.:
A comparison of plasmamembrane, cytomembranes and mitochondrial membrane elements with respect to ultrastructure features
J. Ultrastruct. Res. 9, 561, 1963

-------, and L.G. ELFVIN:
The granular structure of mitochondrial membranes and of cytomembranes as demonstrated in frozen-dried tissue
J. Ultrastruct. Res. 10, 263, 1964

SJÖSTRAND, F.S., E. ANDERSON-CEDERGREN, and U. KARLSSON:
Myelin-like figures formed from mitochondrial material
Nature 202, 1675, 1964

SLOVITER, H.A.:
Mechanism of haemolysis caused by freezing and its prevention
Nature 193, 884, 1962

SMITH, A.U.:
Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells
Lancet 2, 910, 1950

SOMMER, J.R. and J.J. BLUM:
Cytochemical localization of acid phosphatases in Euglena gracilis
J. Cell Biol. 24, 235, 1965

SOTELO, J.R., and K.R. PORTER:
An electron microscope study of the rat ovum
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 327, 1959

SPREY; B.:
Beiträge zur makromolekularen Organisation der Plastiden
II. Zur Verbreitung von DNS in Plastiden
Z. Pflanzenphysiol. 54, 386, 1966

SVETAILO, E.N., I.J. PHILIPPOVICH, and N.M. SISSAKIAN:
Differences in sedimentation properties of chloroplast and cytoplasmic ribosomes from Pea seedlings
J. Mol. Biol. 24, 405, 1967

SWIFT, H.: The fine structure of annulate lamellae
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, Suppl. 415, 1956

SCHIMPER, A.F.W.:
Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde
Jb. wiss. Bot. 16, 1, 1885

SCHMIDT, W.J.:
Über Doppelbrechung und Feinbau der Kernmembran
Protoplasma 32 , 193, 1939

SCHMIDT, W.T.:
Doppelbrechung und Feinbau der Markscheide der Nervenfasern
Z. Zellforsch. 23 , 657, 1936

SCHNEPF, E.:
Zur Feinstruktur der Drüsen von Drosophyllum lusitanicum
Planta 54 , 641, 1960

-------: Plastidenstrukturen bei Passiflora
Protoplasma 54 , 310, 1961

-------: Physiologie und Morphologie sekretorischer Pflanzenzellen
in : Funktionelle und morphologische
Organisation der Zelle
Vol II : Sekretion und Exkretion
( ed. K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN)
Springer Verlag Berlin etc. 1965 p. 72

SCHWARZ, W.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Lysosomen im Blastem der Extremitätenknospe der Ratte
Z. Zellforsch. 73 , 27, 1966

STAEHELIN, A.:
Die Ultrastruktur der Zellwand und des Chloroplasten von Chlorella
Z. Zellforsch. 74 , 325, 1966

STAFFORD, H.A.:
Intracellular localization of enzymes in Pea seedlings
Physiol. Plantarum 4 , 696, 1951

STEINMANN, E.:
An electron microscope study of the lamellae structure of chloroplasts
Exptl. Cell Res. 3 , 367, 1952

-------, and F. SJÖSTRAND:
The ultrastructure of chloroplasts
Exptl. Cell Res. 8 , 15, 1955

STEVENS, B.J.:
The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grashopper neuroblast cell
J. Cell Biol. 24, 349, 1965

STEWARD, F.C., and S.M. CAPLIN:
A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk
Science 113, 518, 1951

-------, M.O. MAPES, A.E. KENT, and R.D.HOLSTEN:
Growth and development of culture plant cells
Science 143, 20, 1964

STOECKENIUS, W.:
The molecular structure of lipid-water systems and cell membrane models studied with the electron microscope
in: The Interpretation of Ultrastructure
Acad. Press New York and London 1962, p.349

-------:
Some observations on negatively stained mitochondria
J. Cell Biol. 17, 443, 1963

-------:
Electron microscopy of fixed lipids
Protoplasma 63, 214, 1 967

TAUSCHEL, H.D und G. DREWS:
Thylakoidmorphogenese bei Rhodopseudomonas palustris
Arch. Mikrobiol 59, 381, 1967

STRUGGER, S.:
Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektromikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen
Naturwissensch. 43, 357, 1956

TERUMOTO, I.:
The relation between the cell sap concentration and the frosthardiness of the table beet
Low Temp. Sci., Ser. B 16, 7, 1958

-------:
Frost resistance in plant cells after immersion in a solution of various inorganic salts
Low Temp. Sci., Ser. B 17, 9, 1959

-------:
Effect of protective agents against freezing injury in lake ball
Low Temp. Sci., Ser. B 18, 43, 1960

THEEDE, H.:
Probleme der Frostresistenz bei Meerestieren
Naturw. Rdsch. 20, 468, 1967

TURNER, F.R., and W.G. WHALEY:
Intercisternal elements of the Golgi apparatus
Science 147, 1303, 1965

UEDA, K.:
Structure of plant cells with special reference to lower plants
VI. Structure of chloroplasts in algae
Cytologia 26, 344, 1961

-------:
The ultrastructure of the chloroplast in Spinacia oleracea
Cytologia 29, 415, 1964

VASIL, J.K., and A.C. HILDEBRANDT:
Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown in vitro
Planta 68, 69, 1966

VERNON, L.P., and B. KE:
Photochemistry of chlorophyll in vivo
in: The Chlorophylls (ed. L.P. VERNON
and G.R. SEELY)
Acad. Press New York and London 1966, p.569

VOS, O., and M.C. KAALEN:
Prevention of freezing damage to proliferating cells in tissue culture
Cryobiology 1, 249, 1965

WARBURG, O.:
Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und über Sauerstoffatm
in Berkefeld-Filtraten wässriger Leberextrakte
Pflügers Arch. 154, 599, 1913

WARTENBERG, H. und H.-E. STEGNER:
Über die elektronenmikroskopische Feinstruktur des menschlichen
Ovarialeies
Z. Zellforsch. 52, 450, 1960

WATSON, M.L.:
Pores in the mammalian nuclear membrane
Biochim. Biophys. Acta 15, 475, 1954

-------:
The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplamic membrane
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 257, 1955

-------:
Further observations on the nuclear envelope of the animal cell
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 147, 1959

WEBER, P.:
Über lamellare Strukturproteide aus Chloroplasten verschiedener Pflanzen
Z. Naturforsch. 17b , 683, 1962

WEIER, T.E.:
Changes in the fine structure of chloroplasts and mitochondria during phylogenetic and ontogenetic development
Am. J. Bot. 50 , 604, 1963

-------, and A.A. BENSON:
The molecular organization of chloroplast membranes
Am. J. Bot. 54 , 389, 1967

-------, T. BISALPUTRA, and A. HARRISON:
Subunits in chloroplast membranes of Scenedesmus quadricauda
J. Ultrastruct. Res. 15 , 38, 1966

WEILING, F.:
Über Pinocytose-Mechanismen im Verlauf der Meiose bei Lycopersicum und Cucurbita unter Berücksichtigung ihrer Bedeutung sowie der Literatur über Pinocytose bei Tier und Mensch
Protoplasma 55 , 372, 1962

WEISSENFELS, N.:
Nachweis von saurer Phosphatase in gezüchteten Hühnerherzmyoblasten
Histochemie 9 , 189, 1967

WERZ, G.:
Untersuchungen zur Feinstruktur des Zellkerns und des perinucleären Plasmas von Acetabularia
Planta 62 , 255, 1964

WESSEL, W. und W. BERNHARD:
Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung an Ehrlich- und Yoshida-Ascitestumorzellen
Z. Krebsforsch. 62 , 140, 1957

WETTSTEIN, D. Von:
Developmental changes in chloroplasts and their genetic control
in : Developmental Cytology
( ed. RUDNICK, D.) p 123
The Ronald Press New York 1959

WHALEY, W.G., and H.H. MOLLENHAUER:
The Golgi apparatus and cell plate formation- a postulate
J. Cell Biol. 17 , 216, 1963

------- -------  -------, and J.H. LEECH:
The ultrastructure of the meristematic cell
Am. J. Bot. 47, 401, 1960

---------- ---------, and J.E. KEPHART:
The endoplasmic reticulum and the Golgi structures in maize root cells
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 501, 1959

WHITE, P.R.:
Cultivation of Animal and Plant Cells
The Ronald Press New York, 1963

WHITFIELD, J.F., and R.G.E. MURRAY:
The effects of the ionic environment on the chromatin structures of bacteria
Can. J. Microbiol. 2, 245, 1956

WILDING, D.M., M.A. STAHMANN, and D. SMITH:
Free amino acids in alfalfa as releated to cold hardiness
Plant Physiol. 35, 726, 1960

WISCHNITZER, S.:
An electron microscope study of the nuclear envelope of amphibian oocytes
J. Ultrastruct. Res. 1, 201, 1958

WITTEKIND, D.:
Pinocytose
Naturwiss. 50, 270, 1963

WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.:
Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektro
nenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten
Naturwiss. 44, 287, 1957

---------:
Grundelemente der Zellstruktur
Naturwiss. 50, 237, 1963

WOLFF, I.:
Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Entstehung von Fibro-
cytenfortsätzen durch Vesikulation
Verh. anat. Ges. 112, 341, 1963

WOLKEN, J.J.:
The chloroplast structure, pigments and pigment protein complex
Brookh. Symp. Biol. 11, 87, 1958

-------, and G.E. PALADE:
Fine structure of chloroplasts in two flagellates
Nature 170, 114, 1952

YAMADA. E., T. MUTA, A. MOTOMURA, and H. KOGA:
The fine structure of the oocyte in the mouse ovary studied with electron microscope
Kurume med. J. 4, 148, 1957

YAMAMOTO, T.:
On the thickness of the unit membrane
J. Cell. Biol. 17, 413, 1963

YOO, B. Y., and S.T. BAYLEY:
The structure of pores in isolated pea nuclei
J. Ultrastruct. Res. 18, 651, 1967

## BILDTEIL

Verzeichnis der im Bildteil verwendeten Abkürzungen

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ANM | = | Äußere Kernmembran | M | = | Mitochondrion |
| BP | = | Mit großen Partikeln besetzte Fläche der Thylakoidmembran | N | = | Kern |
| | | | NM | = | Kernmembran |
| C | = | Cytoplasma | NP | = | Kernpore |
| CHL | = | Chloroplast | P | = | Pellikula |
| CHR | = | Chromatophor | PE | = | Hülle des photosynthetischen Apparates |
| CM | = | Cytoplasmamembran | PW | = | Primärwand |
| DMSO | = | Dimethylsulphoxyd | SP | = | Mit kleinen Partikeln besetzte Fläche der Thylakoidmembran |
| E | = | Einschlußkörper | | | |
| ER | = | Endoplasmatisches Retikulum | SW | = | Sekundärwand |
| G | = | Dictyosom des Golgi-Apparates | T | = | Tonoplast |
| INM | = | Innere Kernmembran | V | = | Vakuole |
| KOM | = | Kokosnußmilch | W | = | Zellwand |
| KP | = | Kernpore | | | |

Anm.: Die Bedampfungsrichtung der Gefrierätzbilder wurde jeweils mit eingekreisten Pfeilen in der rechten unteren Bildecke markiert.

Abb.1: Daucus carota ( Gewebekultur )

Gefrierbruch durch vitrifizierte Zellen nach Applikation von Glycerin + Kokosnußmilch als Gefrierschutzmittel ; neben dem großen Vakuolenraum (V) mit Grenzmembran(T) befindet sich das Cytoplasma (C) meist nur als schmaler Saum durch die Cytoplasmamembran (CM) von der Zellwand (W) abgegrenzt ; innerhalb des Plasmasaums der Zellkern (N) mit Kernmembran (NM) ; zwischen den Zellen Interzellulare (I).

Abb.: 9000 : 1

1

Abb. 2: Gymnodinium spec.

Gefrierbruch durch eine Zelle ; ringförmige Anordnung des Chromatophors (CHR) entlang der Peripherie der Zelle, in derem Inneren ein Dictyosom (G) zu erkennen ist

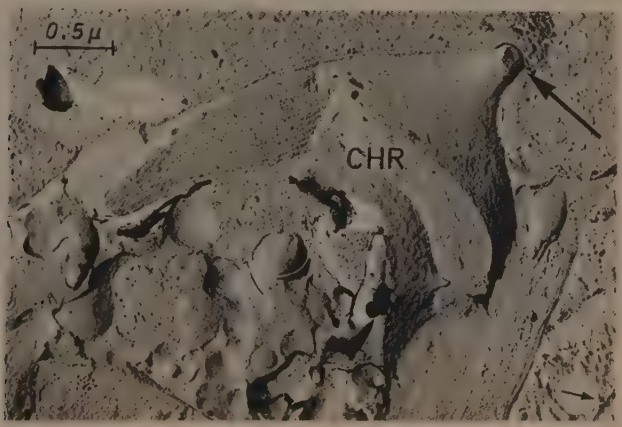
Abb.: 32 OOO : 1

Abb. 3: Gymnodinium spec.

Angebrochenes Chromatophor mit stielartigem Fortsatz ( Pfeil ) zur Zellperipherie

Abb.: 28 OOO : 1

2




3

Abb. 4: Prorocentrum micans

Quergebrochenes Chromatophor mit parallel angeordneten Thylakoiden

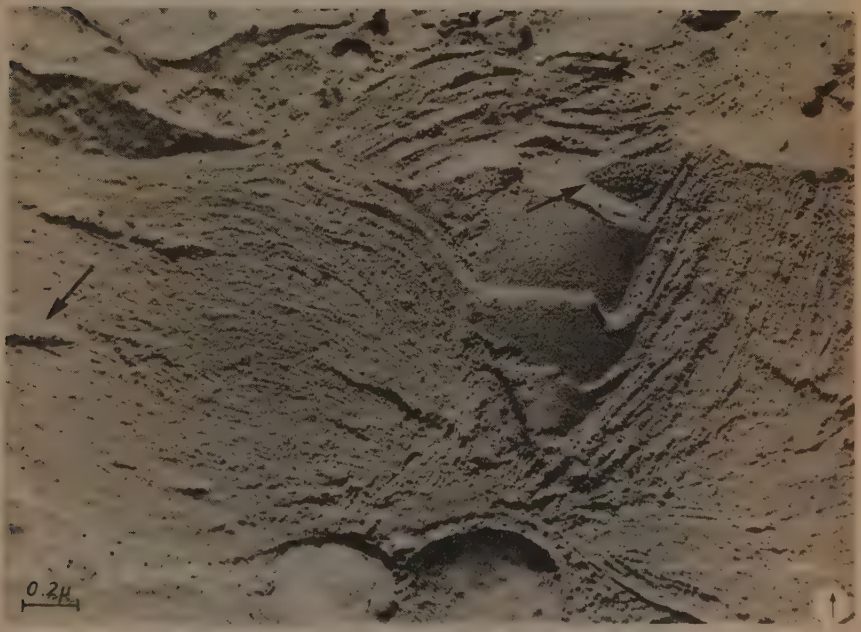
Abb.: 60 000 : 1

Abb. 5: Gymnodinium spec.

Aufgebrochenes Chromatophor mit freigelegten Thylakoidflächen, auf denen sich z.T. Partikel (Pfeile) befinden

Abb.: 60 000 : 1

4




5

Abb. 6: Euglena gracilis

Aufgebrochene Zelle mit Pellikula (P), langgestreckten Chloroplasten (CHL) an der Peripherie und einem multivesikulären Einschlußkörper (MVB)

Abb. 24 OOO :1

Abb. 7: Euglena gracilis

Quergebrochene Thylakoidmembranen der Chloroplasten mit nur angedeutet erkennbarem partikulärem Bau (Pfeile), am oberen Bildrand Einschlußkörper (E)

Abb. 60 OOO :1

6

7

Abb. 8: Euglena gracilis

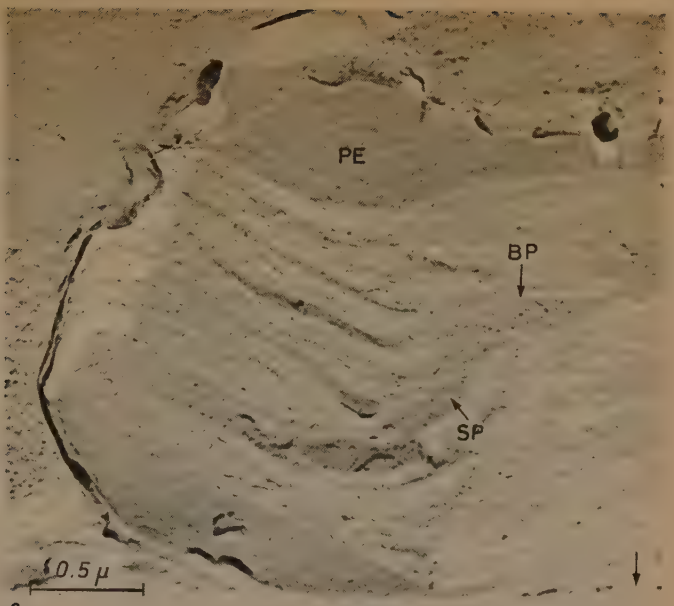
Aufgebrochener Chloroplast ; Thylakoidoberflächen mit großen Partikeln (BP) und kleinen Partikeln (SP) ; die Plastidenhüllmembran (PE) dunkel kontrastiert

Abb.: 40 000:1

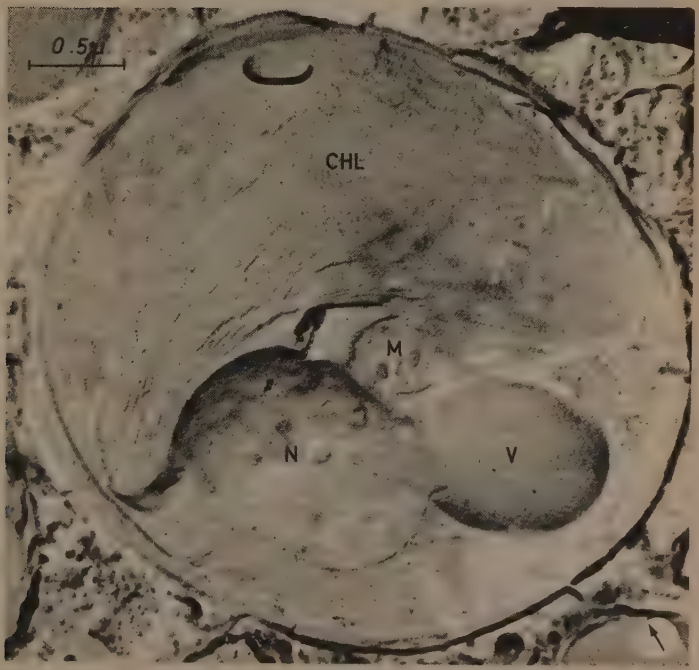
Abb. 9: Chlorella saccharophila

Aufgebrochene Zelle mit großem halbmondförmigen Chloroplasten ( CHL) sowie Kern (N), Mitochondrion (M) und Vakuole (V)

Abb.: 34 000:1




8

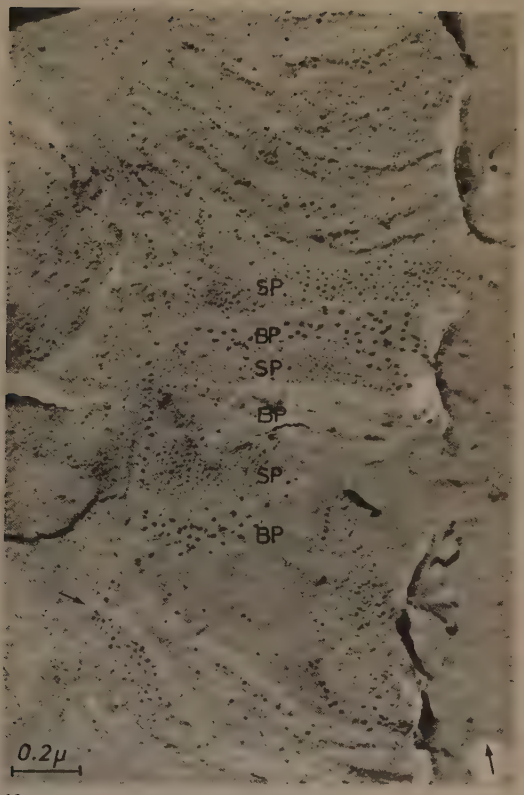



9

Abb. 10: Chlorella saccharophila

Aufgebrochener Chloroplast mit freigelegten Thylakoidflächen, die alternierend mit großen (BP) und kleinen (SP) Partikeln bedeckt sind ; Plastidenhülle als Doppelmembran (Pfeil) erkennbar.

Abb.: 60 000 : 1




10

Abb.11: Chlorella saccharophila

Flächenbruch durch einen Chloroplasten mit SP-und BP-Flächen in höherer Auflösung ; innerhalb der BP-Fläche ein Teil ohne Partikelbesatz ; große Partikel möglicherweise aus Untereinheiten aufgebaut (Pfeil)

Abb. 120 000 : 1

11

Abb.12: Chlorella pyrenoidosa

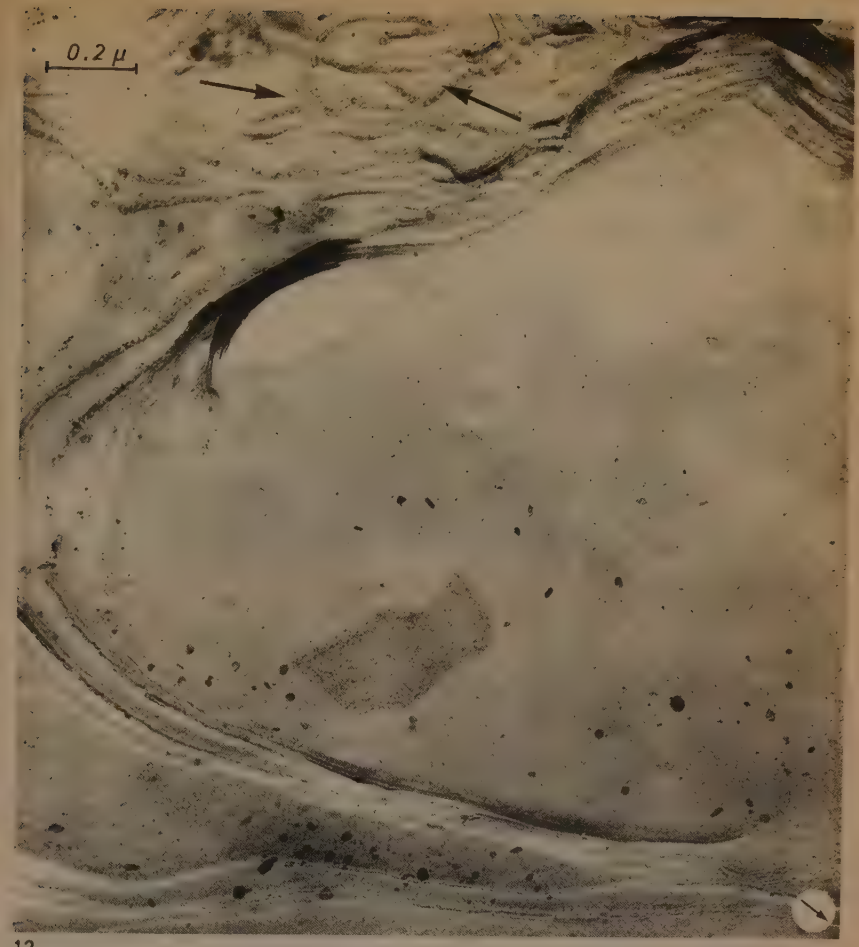
Aufgebrochener Chloroplast mit degradiertem Thylakoidsystem nach Bleichung mit Glukose ; neben konzentrisch angeordneten partikellosen Thylakoidmembranen Reste partikulärer Membranen (Pfeile) ; große freigelegte Membran im Zentrum mit mosaikartiger Textur.

Abb.: 80 000 :1

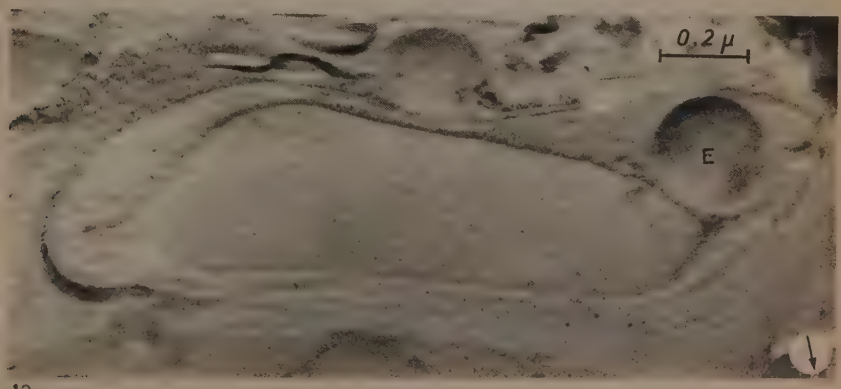
Abb. 13: Chlorella pyrenoidosa

Aufgebrochener Chloroplast mit degradiertem Thylakoidsystem nach Bleichung mit Glukose ; Reste partikulärer Membranen verschwunden ; neben der freigelegten Membran ein Einschlußkörper (E)

Abb. 80 000 : 1




12




13

Abb. 14: Marchantia polymorpha

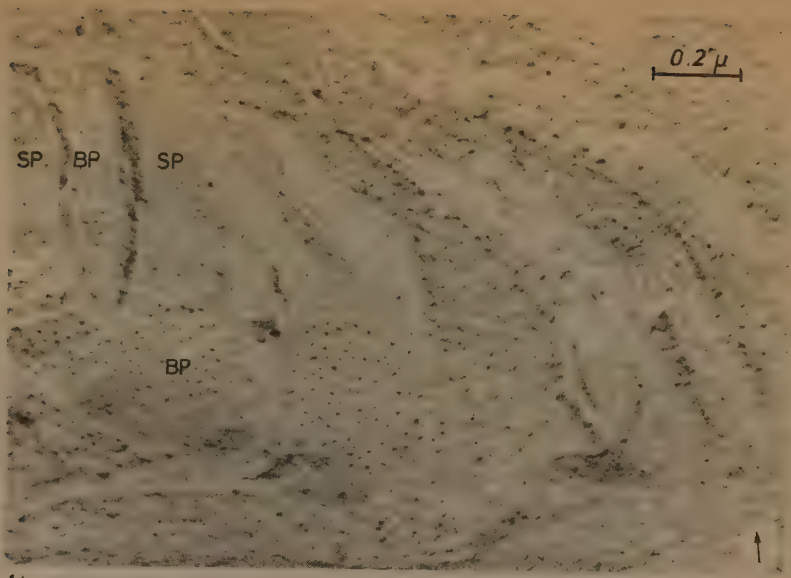
Aufgebrochener Chloroplast mit locker verteilten großen Partikeln (BP) und dicht angeordneten kleinen Partikeln (SP).

Abb.: 80 000 :1

Abb. 15: Asplenium adiantum nigrum

Flächenbruch durch einen Chloroplasten mit SP-und BP-Flächen , die meist durch stärker kontrastierte Bruchkanten voneinander abgegrenzt sind.

Abb. :80 000 : 1




14

15

Abb. 16: Daucus carota ( Gewebekultur )

Aufgebrochener Chloroplast mit locker verteilten großen Partikeln (BP) und dicht angeordneten kleinen Partikeln (SP); links oben drei angebrochene Membranen mit kleinen Partikeln ( Pfeile )

Abb.: 40 000 : 1

16

Abb. 18: Daucus carota ( Gewebekultur )

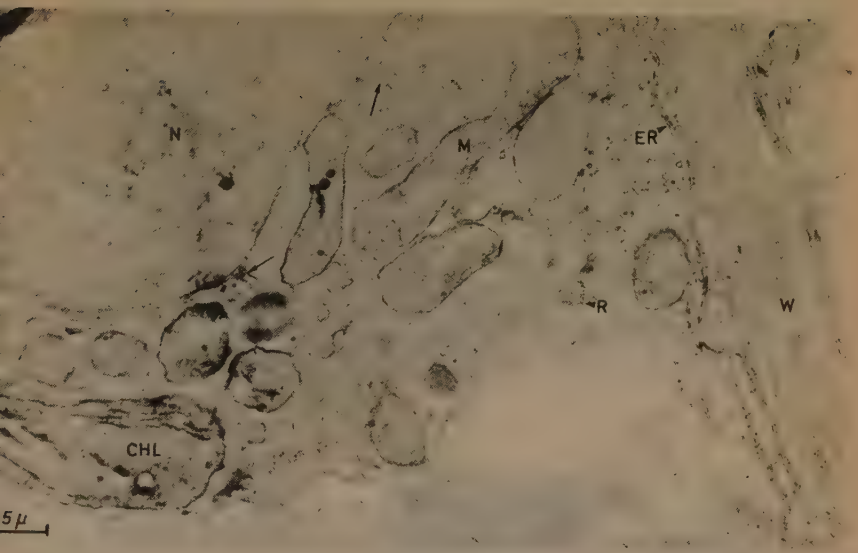
Dünnschnitt durch eine Zelle nach Permanganatfixierung ; Chloroplast (CHL) mit geringer Zahl von Thylakoiden ; Kern (N) mit Ausstülpungen der doppelten Kernmembran in das Cytoplasma (Pfeile) ; Schläuche des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Ribosomen, daneben auch freie Ribosomen (R) ; Mitochondrion mit Tubuli (M) ; Zellwand (W) an der Peripherie punktförmig kontrastiert

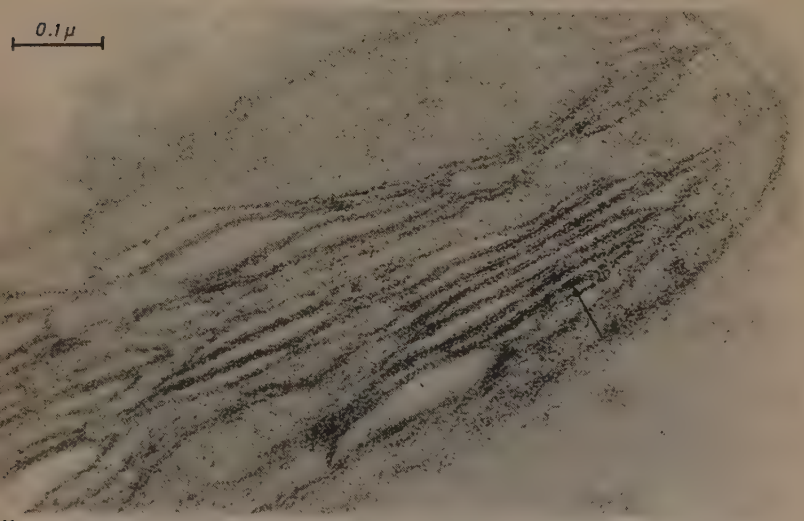
Abb.: 36 000 : 1

Abb. 19: Daucus carota ( Gewebekultur )

Dünnschnitt durch einen Chloroplasten nach Permanganatfixierung mit partikulär erscheinendem Bau des Membransystems ( Pfeil )

Abb.: 200 000 : 1




19

Abb. 20: Daucus carota

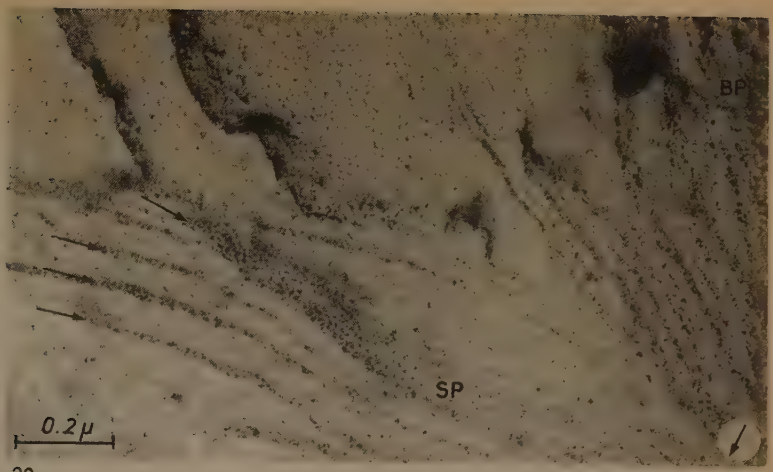
Teil eines aufgebrochenen Chloroplasten aus den Primärblättern einer jungen Pflanze mit großen Partikeln (BP) und Flächen mit kleinen Partikeln (SP) ; angebrochene Thylakoidflächen wurden mit Pfeilen markiert

Abb.: 90 000 : 1

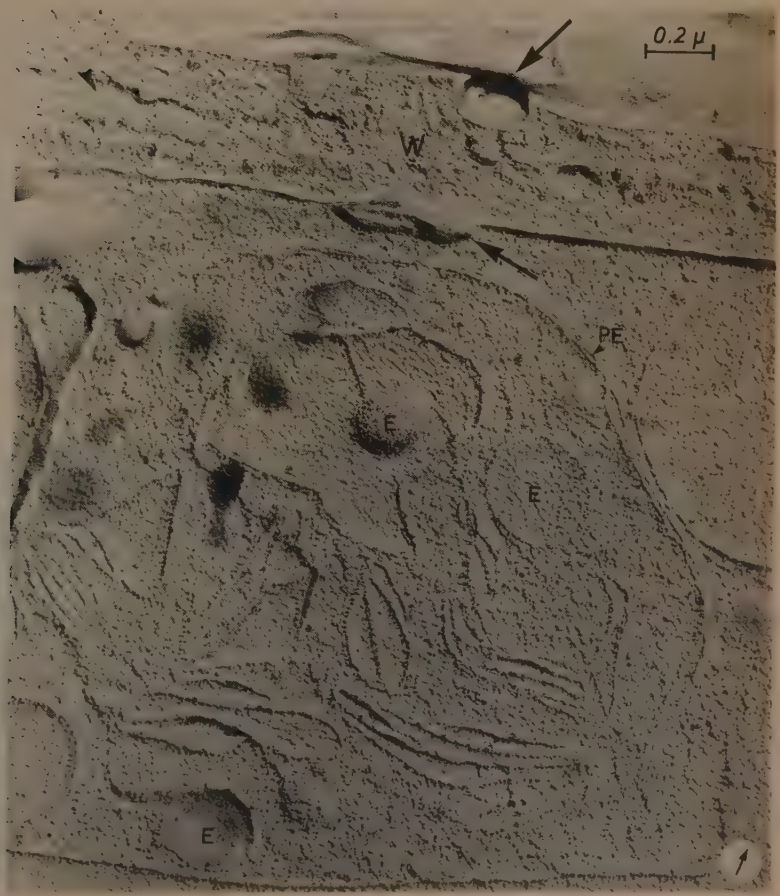
Abb. 21: Rhinanthus alectorolophus

Aufgebrochener Chloroplast aus einer Samenanlage mit doppelter Plastidenhülle (PE) ; Thylakoidsystem mit geringem Ordnungszustand , einige Einschlüsse (E) ; oberhalb des Chloroplasten Bläschen ( Pfeile ) in der Zellwand (W).

Abb.: 60 000 : 1




20




21

Abb. 22: Prorocentrum micans

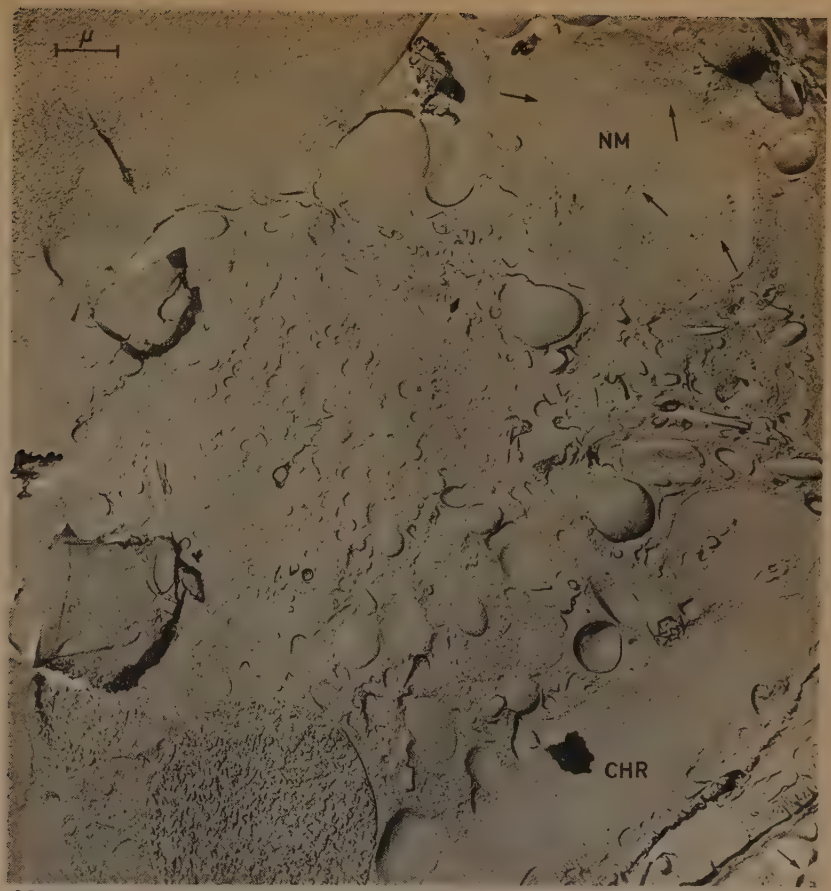
Aufgebrochener Dinoflagellat mit Chromatophor (CHR) und freigelegter Kernmembran (NM), auf der die Kernporen in Gruppen angeordnet sind ( Pfeile ).

Abb.: 10 000 : 1

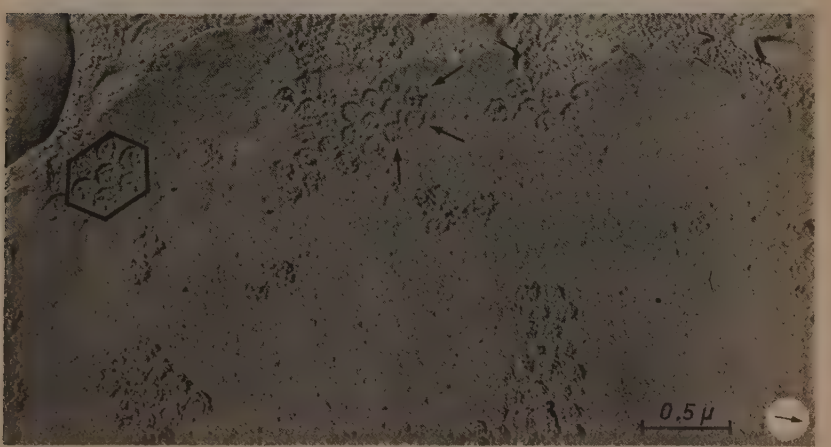
Abb. 23: Prorocentrum micans

Ausschnitt aus Abb. 22
Hexagonale Anordnung der Kernporen in den Porengruppen (vergl. markiertes Sechseck); in einer anderen Porengruppe wurden die drei Symmetrieachsen des Sechsecks mit Pfeilen markiert.

Abb.: 32 000 : 1




22

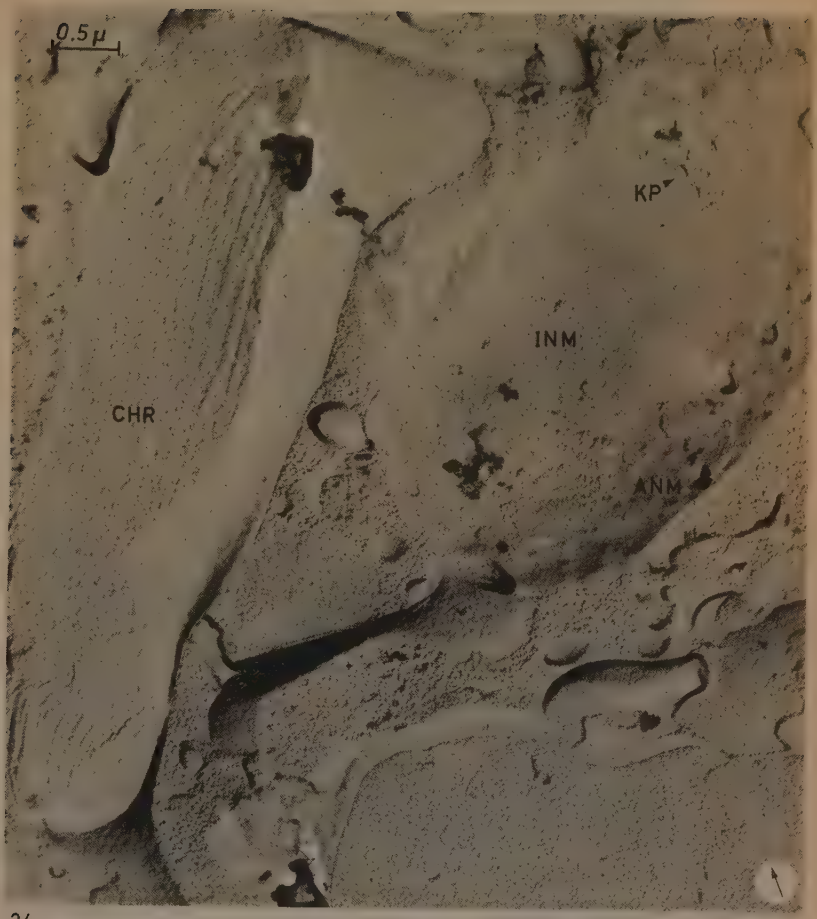



23

Abb. 24: Prorocentrum micans

Aufgebrochene doppelte Kernhülle mit äußerer Kernmembran (ANM) und innerer Kernmembran (INM) sowie Kernporen (KP); daneben Chromatophor (CHR)

Abb.:24 OOO : 1




24

Abb. 25: Euglena gracilis

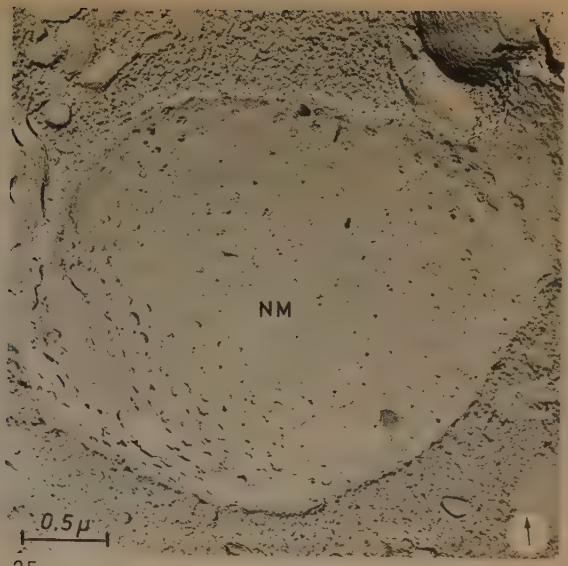
Angebrochene Kernmembran (NM) mit Poren, die in Gruppen locker angeordnet sind.

Abb.:30 000:1

Abb. 26: Euglena gracilis

Angebrochene Kernmembran mit hexagonal angeordneten Poren ; die drei Symmetrieachsen wurden mit Pfeilen markiert.

Abb.:75 000 : 1




25

26

Abb. 27: Chlorella pyrenoidosa

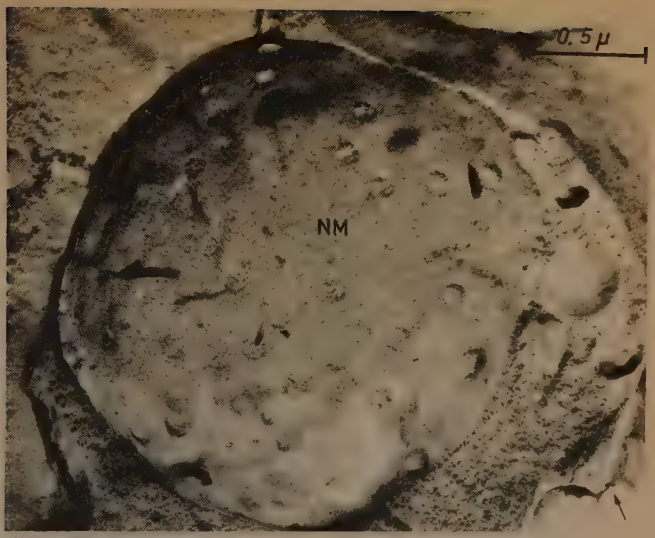
Angebrochene Kernoberfläche (NM) mit statistisch verteilten Poren

Abb.: 43 OOO:1

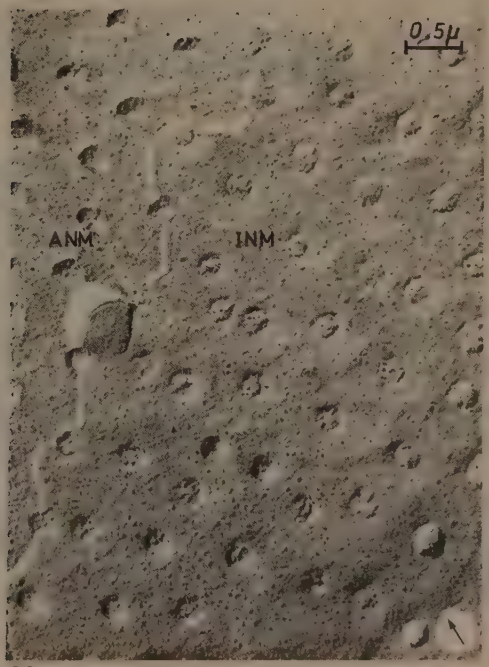
Abb. 28: Asplenium adiantum nigrum

Angebrochene Kernoberfläche mit äußerer Kernmembran(ANM) und innerer Kernmembran (INM) , die durch eine Bruchkante voneinander getrennt sind

Abb.:5O OOO : 1




27




28

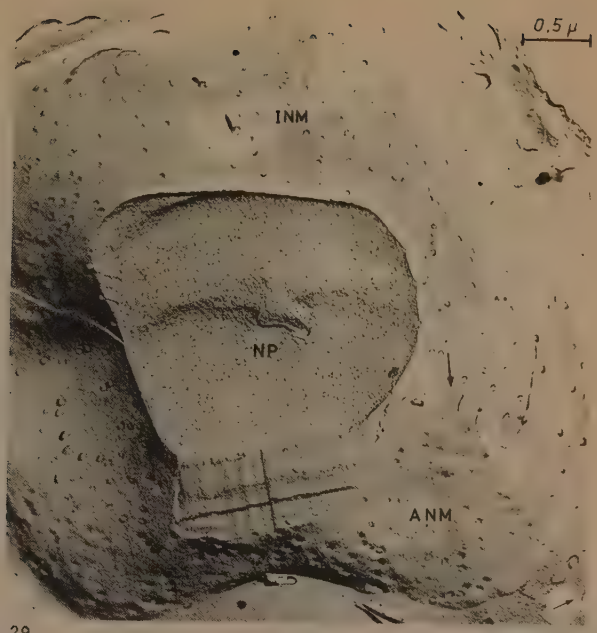
Abb. 29: Crocus kotschyanus (Gewebekultur)
Aufgebrochener Kern mit äußerer Kernmembran (ANM) und innerer Kernmembran (INM), deren Flächen durch Bruchkanten ( Pfeile ) voneinander getrennt sind ; im Zentrum Teil des Kernplasmas ( NP ) freigelegt.

Abb.: 30 000 : 1

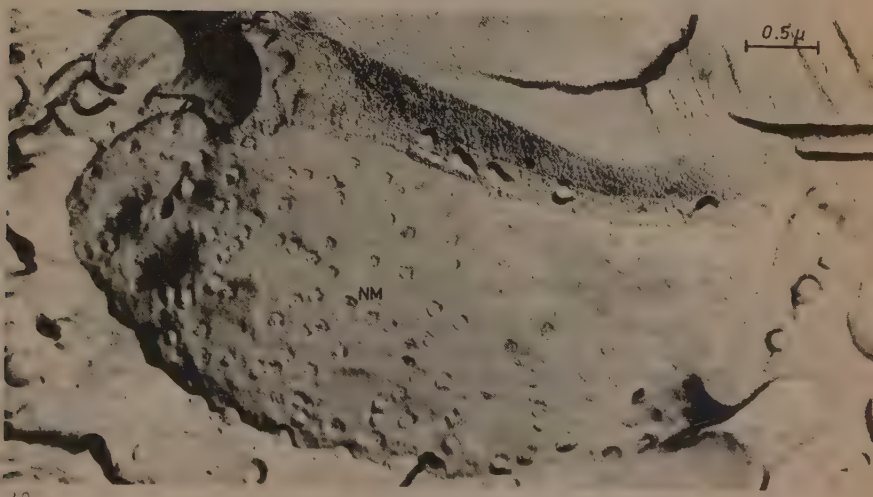
Abb. 30: Crocus kotschyanus ( Gewebekultur )

Angebrochene, langgestreckte Kernoberfläche ( NM ) einer parenchymatischen Zelle mit statistisch verteilten Poren

Abb.: 32 000 : 1




29




30

Abb. 31: Rhinanthus alectorolophus

Angebrochene Kernoberfläche (NM) ; neben Poren mit großem Durchmesser (Pfeile) sind solche mit kleinerem Durchmesser zu erkennen ; Cytoplasmamembran ( CM ) mit Partikelbesatz

Abb.: 60 000 : 1

31

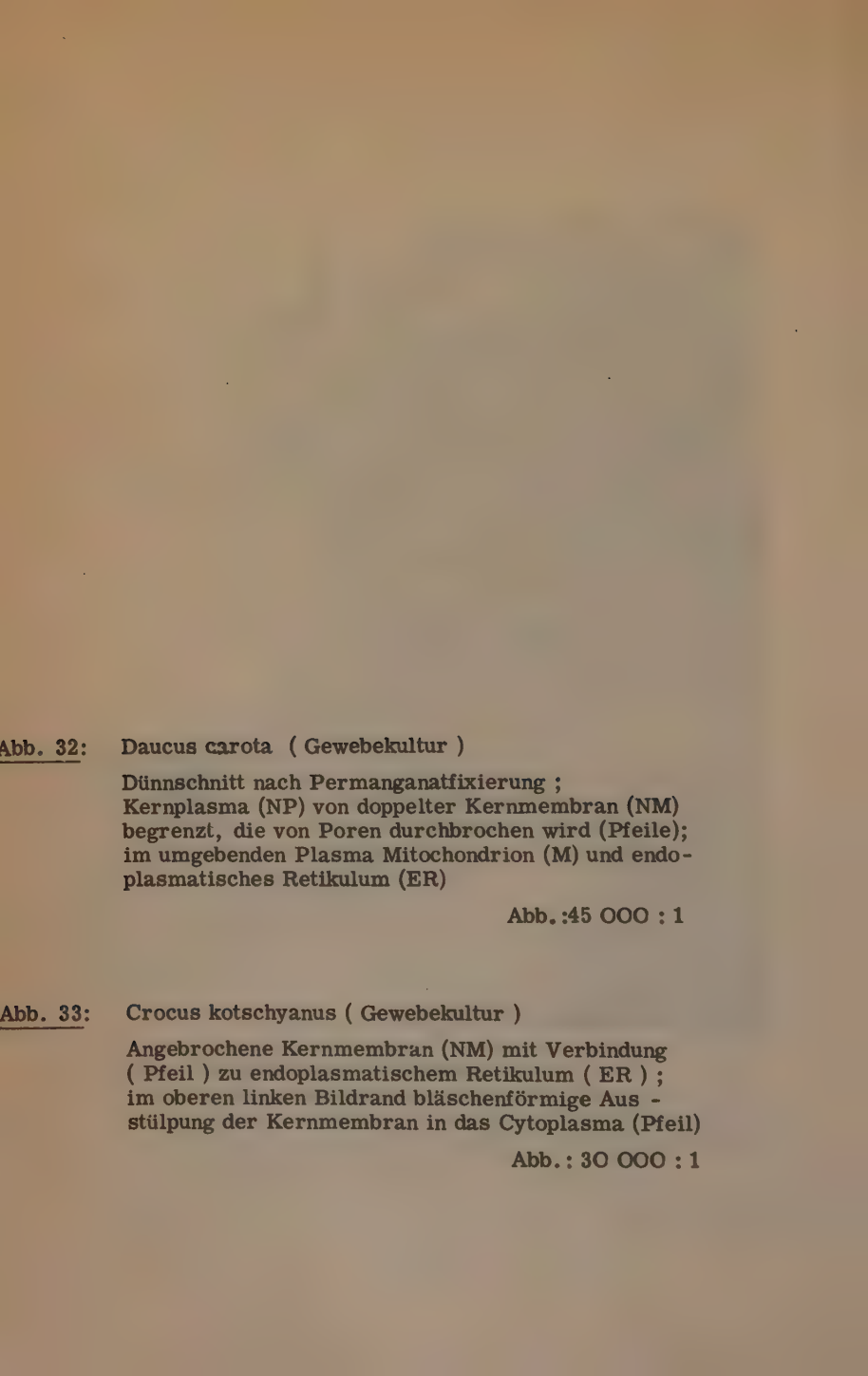


Abb. 32: Daucus carota ( Gewebekultur )

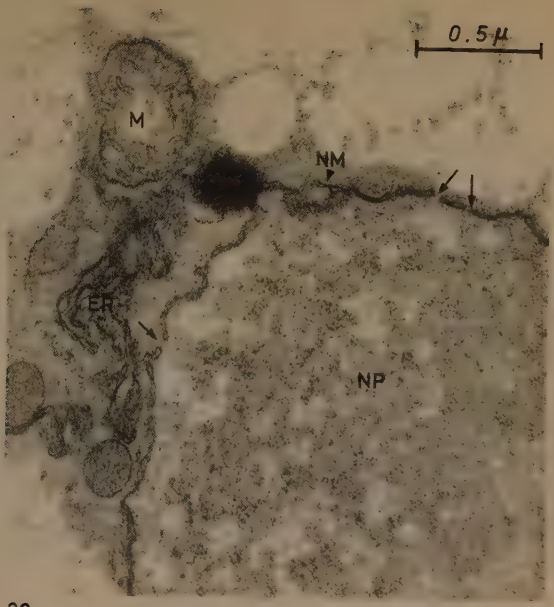
Dünnschnitt nach Permanganatfixierung ;
Kernplasma (NP) von doppelter Kernmembran (NM) begrenzt, die von Poren durchbrochen wird (Pfeile); im umgebenden Plasma Mitochondrion (M) und endoplasmatisches Retikulum (ER)

Abb.:45 OOO : 1

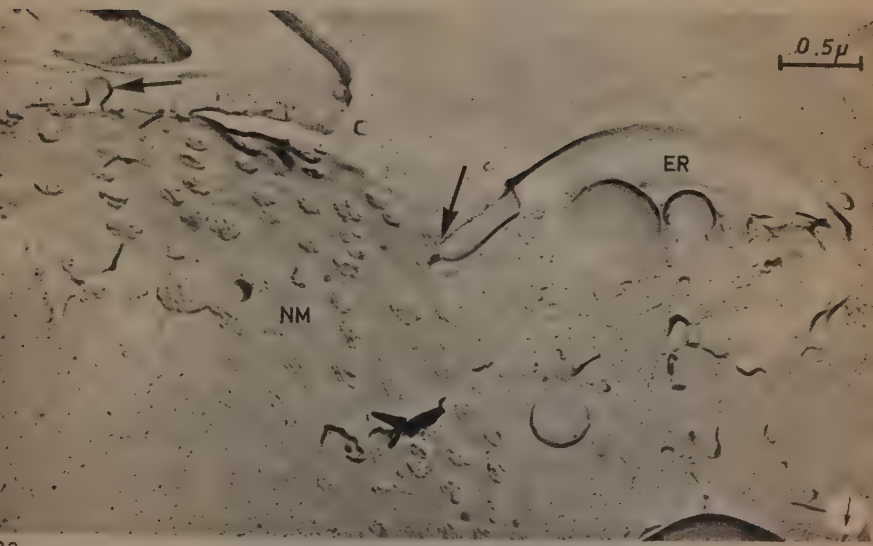
Abb. 33: Crocus kotschyanus ( Gewebekultur )

Angebrochene Kernmembran (NM) mit Verbindung ( Pfeil ) zu endoplasmatischem Retikulum ( ER ) ; im oberen linken Bildrand bläschenförmige Aus - stülpung der Kernmembran in das Cytoplasma (Pfeil)

Abb.: 30 OOO : 1




32




33

Abb. 34: FL-Zellen ( menschliche Gewebekultur )

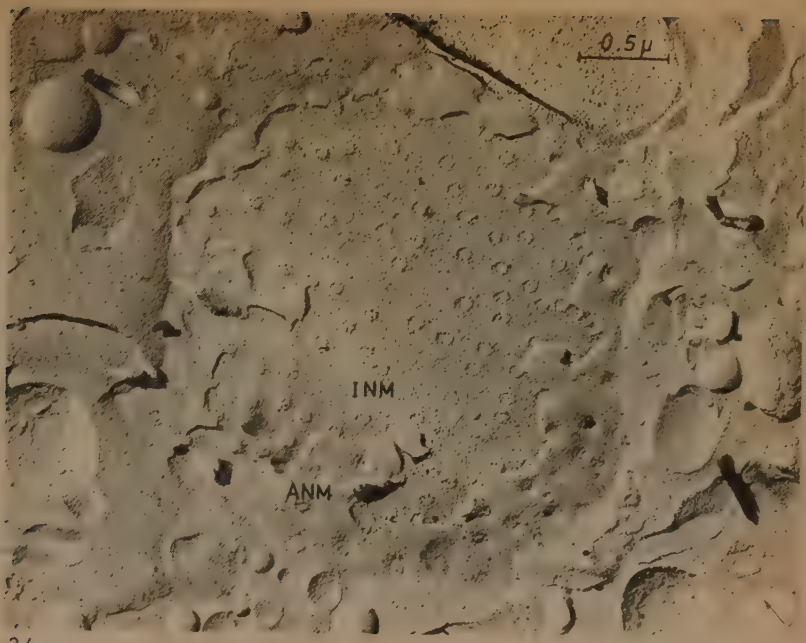
Aufgebrochene Kernmembran mit deutlich erkennbarer Bruchkante zwischen äußerer Kernmembran ( ÄNM ) und innerer Kernmembran ( INM )

Abb.: 52 000 : 1

Abb. 35: FL-Zellen ( menschliche Gewebekultur )

Querbruch durch die Kernmembran mit pilzförmigem Austritt des Kernplasmas (NP) aus den Poren (Pfeile) in das Cytoplasma (C)

Abb.: 40 000 :1




34

Abb. 36: Chlorella saccharophila

Aufgebrochene Zelle mit Cytoplasmamembran (CM), Chloroplast (CHL) und Vakuolen (V) ; auf der Cytoplasmamembran quer zur Längsachse der Zelle orientierte Invaginationen

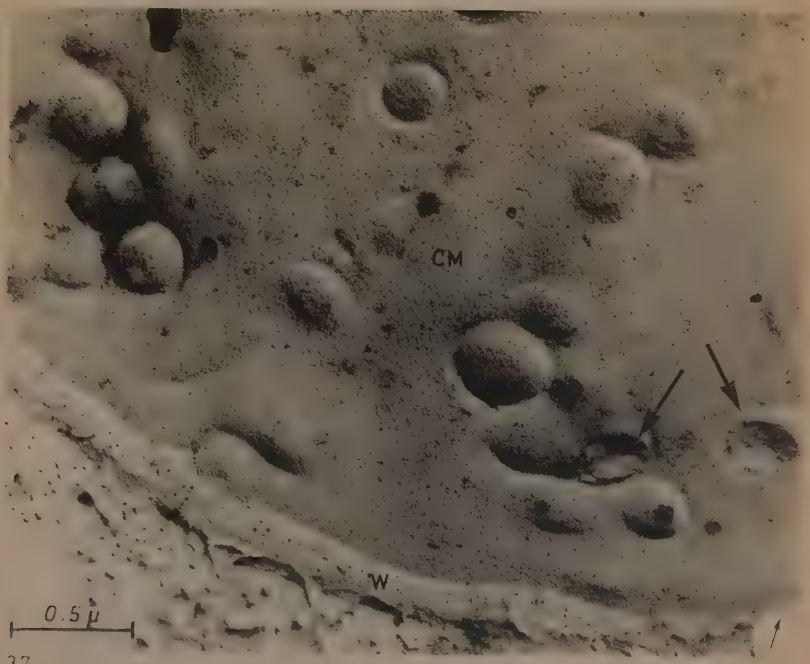
Abb.: 30 000:1

Abb. 37: Chlorella saccharophila

Angebrochene Cytoplasmamembran (CM) einer wachsenden Zelle mit ringförmigen Invaginationen, die z.T. aufgebrochen sind (Pfeile); am unteren Bildrand fibrilläre Zellwand (W)

Abb.: 45 000:1

36



37

Abb. 38: Penicillium spec.

Angebrochene Cytoplasmamembran (CM) mit Invaginationen; in der Zellwand (W) orientierte Fibrillen ( Pfeile )

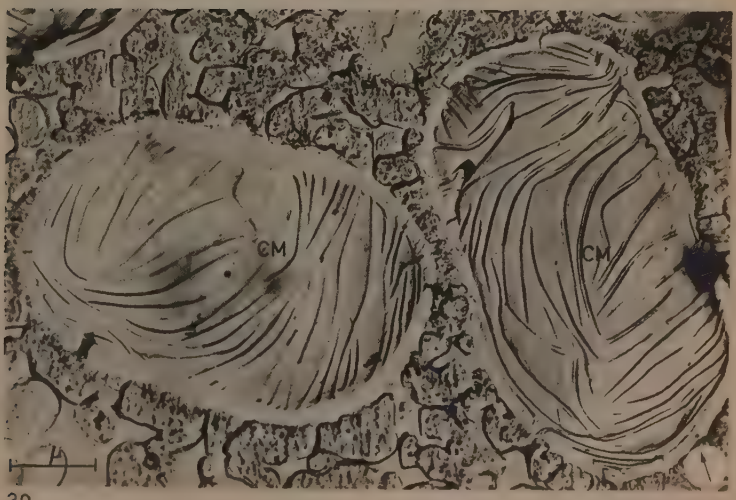
Abb.: 50 000 :1

Abb. 39: Schizosaccharomyces pombe

Angebrochene Cytoplasmamembran (CM) mit langgestreckten Invaginationen

Abb.: 16 000 : 1

38




39

Abb.40: FL-Zellen ( menschliche Gewebekultur )

Angebrochene Cytoplasmamembran (CM) ohne Invaginationen und Partikelbesatz mit mosaikartiger Textur; unterhalb der Cytoplasmamembran aufgebrochenes Cytoplasma ( C )

Abb.: 40 000 : 1

40

Abb. 41: Euglena gracilis

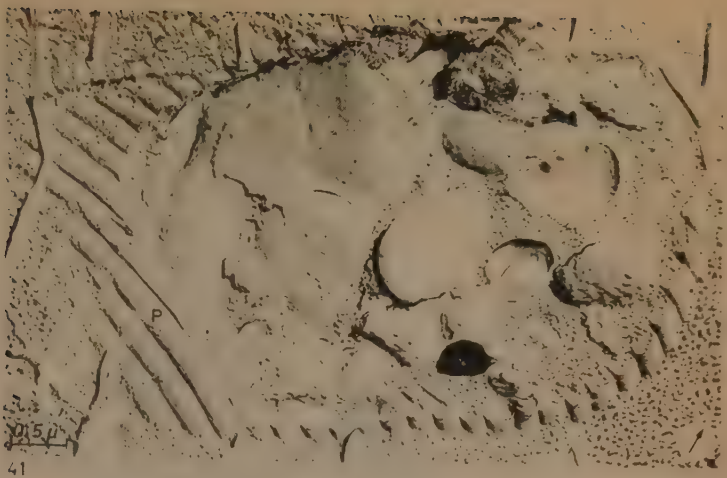
Aufgebrochene Zelle mit freigelegter Pellikula (P)

Abb.:24 000:1

Abb.42: Euglena gracilis

Angebrochene Pellikula mit drei verschiedenen freigelegten Membranflächen: in der rechten oberen Bildecke glatte, strukturlose Oberfläche, links daneben partikuläre Schicht und im unteren Teil des Bildes Fläche mit linear angeordneten Makromolekülen, deren Richtung mit Pfeilen markiert wurde.

Abb.: 150 000 : 1




41

42

Abb. 43: Daucus carota ( Gewebekultur )

Aufgebrochene Zelle mit geringem plasmatischem Anteil ; scharfe Grenze zwischen Primärwand (PW) und Sekundärwand (SW) ; in der Sekundärwand Paralleltextur der Zellulosefibrillen erkennbar ( CM = Cytoplasmamembran )

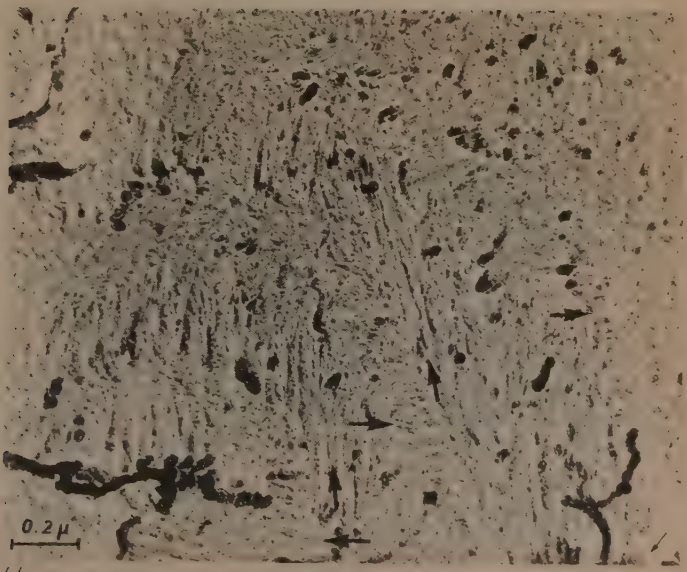
Abb.: 24 000 : 1

Abb. 44: Crocus kotschyanus ( Gewebekultur )

Aufgebrochene Sekundärwand einer Zelle mit gekreuzter Paralleltextur ( Pfeile ) ; ein Teil der Zellulosefibrillen ist herausgerissen

Abb.: 70 000 : 1

43




44

Abb. 45: **Euglena gracilis**

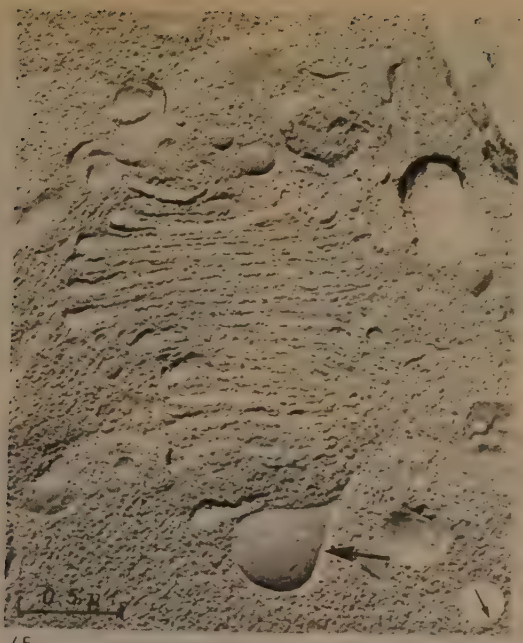
Dictyosom mit zahlreichen Zisternen und Zentralkörper (Pfeil)

Abb.: 38 000 : 1

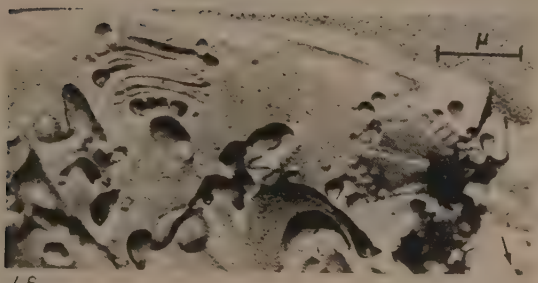
Abb. 46: **Daucus carota (Gewebekultur )**

Zwei angebrochene Dictyosomen ; links ein Querbruch, rechts ein Flächenbruch entlang einer Zisternenmembran mit peripherwärts sich abschnürenden Vesikeln

Abb.: 15 000 : 1




45




46

Abb. 6a: Euglena gracilis
( Ausschnittvergrößerung aus Abb. 6)

Aufgebrochener Multivesicular Body ( MVB) ;
Im Inneren sind Bläschen von unterschiedlicher Größe erkennbar

Abb.: 40 000 : 1

Abb. 47: Euglena gracilis

Angebrochene Hülle eines multivesikulären Körpers ( MVB ) mit Abdrucken der Bläschen

Abb.: 32 000 : 1

Abb. 48: Euglena gracilis

Aufgebrochener Multivesicular Body ( MVB) mit Membranrest ( Pfeil) sowie Bläschentransport durch die Hüllmembran ( großer Pfeil )

Abb.: 45 000 : 1

Abb. 49: Euglena gracilis

Aufgebrochener Multivesicular Body (MVB ) in Kontakt ( Pfeil ) mit einem Dictyosom ( G )

Abb.: 32 000 : 1

Abb. 50: Daucus carota ( Gewebekultur )

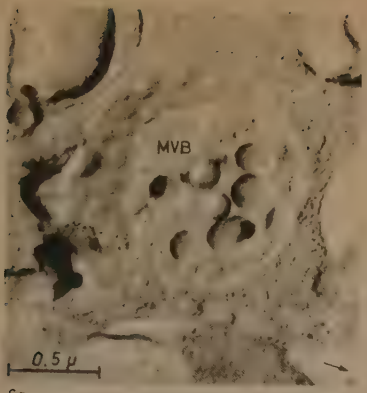
Aufgebrochener Multivesicular Body ( MVB ) mit zahlreichen kleinen Bläschen gefüllt

Abb.: 24 000 : 1

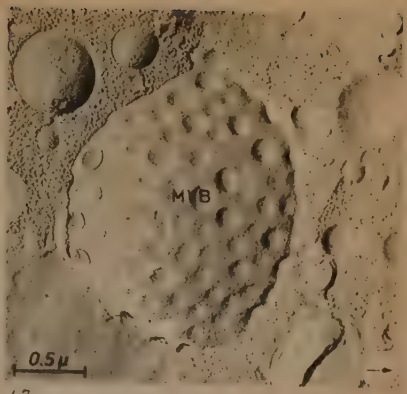
Abb. 51: FL-Zellen ( menschliche Gewebekultur )

Aufgebrochener Multivesicular Body ( MVB ) mit einigen großen Bläschen in Nachbarschaft des Kern (N)

Abb.: 32 000 : 1

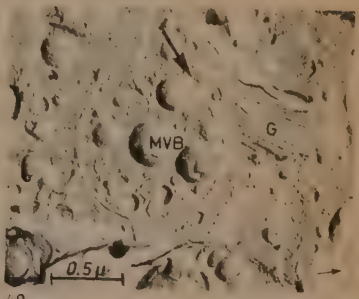


6a

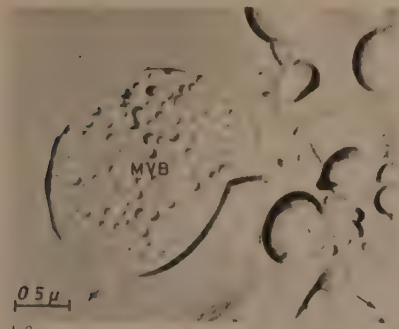


47

48



49



50

51

Dem Leiter des Robert Koch-Institutes und Vizepräsidenten des Bundesgesundheitsamtes, Herrn Prof. Dr. G. Henneberg, danke ich sehr herzlich für den Arbeitsplatz im Robert Koch-Institut sowie für großzügige finanzielle Unterstützung.

Ebenso sage ich an dieser Stelle dem Direktor des Institutes für Genetik der Freien Universität Berlin, Herrn Prof. Dr. H. Lüers, für sein Entgegenkommen und wohlwollendes Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen meinen besonderen Dank.

Meinem Lehrer, Herrn Priv.-Doz. Dr. P. Giesbrecht, danke ich besonders herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und das Interesse an den Ergebnissen sowie für zahlreiche klärende Diskussionen.

## Lebenslauf

Am 11. Juli 1939 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Werner Wecke und seiner Ehefrau Johanna, geb. Stachelhaus, in Berlin geboren.

In Berlin-Pankow besuchte ich von 1945 - 1953 die Grundschule. Anschließend kam ich auf die Friedrich-List-Oberschule ( naturwissenschaftlicher Zweig), die ich nach bestandener Reifeprüfung 1957 verließ.

Im Herbst 1957 wurde ich an der landwirtschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität immatrikuliert. Auf Grund politischer Schwierigkeiten wurde ich im Sommer 1958 von der Humboldt-Universität relegiert. Nach Absolvierung der Ergänzungsprüfung für das Ostberliner Abitur in Westberlin studierte ich, beginnend im Wintersemester 1958/59, an der Freien Universität Berlin die Fächer Biologie, Chemie, Geographie sowie Hygiene und medizinische Mikrobiologie.

Im Sommer 1964 legte ich das Staatsexamen für das höhere Lehramt ab und begann im Herbst 1964 mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Membranstrukturen am Robert Koch-Institut. Mein besonderes Interesse gilt der makromolekularen Biologie.